



**Importance de la cassiicoline en tant qu'effecteur de la  
Corynespora Leaf Fall (CLF) chez l'hévéa :  
Développement d'outils pour le contrôle de la maladie**  
Marine Deon

► **To cite this version:**

Marine Deon. Importance de la cassiicoline en tant qu'effecteur de la Corynespora Leaf Fall (CLF) chez l'hévéa : Développement d'outils pour le contrôle de la maladie. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. <NNT : 2012CLF22239>. <tel-00741952>

**HAL Id: tel-00741952**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00741952>**

Submitted on 15 Oct 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE  
SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire)

Soutenue le 24 avril 2012

Marine DEON

---

**Importance de la cassiicoline en tant qu'effecteur de la  
Corynespora Leaf Fall (CLF) chez l'hévéa.  
Développement d'outils pour le contrôle de la maladie**

---

**Président :**

Philippe SIMONEAU, Professeur, UMR 1345 IRHS, INRA, Angers

**Rapporteurs :**

Philippe SIMONEAU, Professeur, UMR 1345 IRHS, INRA, Angers

Michel NICOLE, Directeur de Recherche, UMR RPB, IRD, Montpellier

**Examineurs :**

Valérie PUJADE-RENAUD, Chargé de Recherche, UMR AGAP (CIRAD)/UMR PIAF (UBP), Aubière

Daniel BIEYSSE, Chargé de Recherche, UMR BGPI, CIRAD, Baillarguet

Frédéric BRETON, Chargé de Recherche, UMR AGAP, CIRAD, Montpellier

Patricia ROECKEL-DREVET, Professeur, UMR PIAF, Université Blaise Pascal, Aubière

**Laboratoire de Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier (UMR 547 PIAF)  
Université Blaise Pascal**





IFC, SOCFIN



Ces travaux ont été cofinancés par le Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), l'Institut Français du Caoutchouc (IFC), la Manufacture Française des Pneumatiques Michelin, la Société Internationale de Plantations d'Hévéa (SIPH) et la Société SOCFIN.

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'UMR de Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier (UMR 547 PIAF) à l'Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II.







## Résumé

L'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est actuellement la seule source commerciale de caoutchouc naturel. Parmi les maladies affectant l'hévéa, la CLF (« *Corynespora* Leaf Fall ») causée par le champignon *Corynespora cassiicola*, est devenue en une cinquantaine d'années un fléau pour l'ensemble des pays hévéicoles d'Asie et d'Afrique. Actuellement, la gestion du problème consiste à arracher les clones les plus sensibles et à traiter les arbres avec des fongicides en cas d'épidémie. Cependant, le nombre de clones touchés par la maladie ne cessant d'augmenter, il devient urgent de sélectionner de nouveaux clones à la fois tolérants et aptes à la production.

Nos travaux ont permis de caractériser le gène codant la cassiicoline, toxine protéique glycosylée sécrétée par *C. cassiicola*, et d'analyser sa diversité.

Une étude comparative portant sur trois isolats de *C. cassiicola* d'agressivité contrastée a montré la présence du gène *Cas1* chez les isolats de forte et moyenne agressivité, alors qu'il n'est pas détecté chez l'isolat de faible agressivité. Les niveaux d'agressivité des isolats sont corrélés aux niveaux de transcrits du gène de cassiicoline. Le rôle de la cassiicoline serait prépondérant dans les phases précoces de l'infection.

L'analyse de diversité du gène de cassiicoline à partir d'une collection d'isolats provenant de différents hôtes et d'origines géographiques variées, a révélé l'existence d'au moins six isoformes protéiques (*Cas1* à *Cas6*). La structuration génétique globale des isolats basée sur des marqueurs neutres est similaire à la structuration basée sur le gène de cassiicoline. Les isolats prélevés sur hévéa se regroupent en clades spécialisés, dont un correspondant aux isolats porteurs du gène *Cas1*, identifiés comme étant les plus agressifs sur hévéa. Cependant, 58 % des isolats testés semblent dépourvus de gène de cassiicoline, bien que certains génèrent des symptômes modérés sur hévéa, ce qui suggère l'existence d'autres effecteurs.

Des formes endophytiques de *C. cassiicola* ont été isolées à partir de feuilles asymptomatiques provenant du Brésil, zone encore indemne de CLF. Les gènes de cassiicoline portés par ces souches (isoformes *Cas3* et 4) ne semblent pas exprimés lors de l'interaction avec l'hévéa. Nous avons montré par ailleurs que les champignons endophytes de l'hévéa appartenant aux genres *Trichoderma* et *Xylaria* présentent une forte activité mycoparasitaire sur *C. cassiicola*, *in vitro*.

Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le contrôle de la maladie (diagnostic précoce, sélection de clones tolérants, lutte biologique).

**Mots clé :** *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, cassiicoline, diversité, champignons, endophytes, CLF.



# Abstract

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the only source of commercial natural rubber. The “Corynespora Leaf Fall” (CLF) disease, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, has become over the last 50 years a very serious problem in the Asian and African rubber producing countries. Currently, the main methods to face the problem are the uprooting of the most susceptible cultivars and chemical treatments in case of severe outbreaks. However, the number of cultivars affected by the disease keeps increasing, and the selection of new cultivars, both tolerant and high yielding, is urgent.

In this study, the gene encoding cassiicolin, a toxic glycosylated protein secreted by *C. cassiicola*, was characterized and its diversity analyzed.

The analysis of three *C. cassiicola* isolates with contrasted levels of aggressiveness revealed the presence of identical cassiicolin genes in the highly and moderately aggressive isolates but none in the isolate of mild aggressiveness. The levels of aggressiveness were correlated to the cassiicolin gene transcript levels. The cassiicolin gene was preferentially expressed in the early phase of the infection.

Analysis of the cassiicolin gene diversity among isolates from various host and various geographical origins revealed the existence of at least six protein isoforms (Cas1 to Cas6). The genetic structure of the isolates based on neutral markers was closely related to the genetic structure based on the cassiicolin gene. The isolates sampled on rubber tree were grouped in several specialized clades, including one clade regrouping all the Cas1 isolates, which were the most aggressive on rubber tree. However, 58 % of the isolates seemed to be deprived of cassiicolin gene, although some of them generate moderate symptoms on rubber tree, suggesting the existence of other effectors.

Endophytic *C. cassiicola* isolates were found in asymptomatic rubber tree leaves from Brazil, a region where CLF outbreak was never reported. No expression of the cassiicolin genes carried by these isolates could be detected in interaction with rubber tree. In addition, we found that the *Trichoderma* and *Xylaria* species, all fungal endophytes of rubber tree, were antagonists of *C. cassiicola*, *in vitro*.

This work opens new perspectives for the control of CLF (through early diagnosis, selection of tolerant clones, or biocontrol).

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, cassiicolin, diversity, fungi, endophytes, CLF



## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, messieurs Philippe Simoneau et Michel Nicole, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Egalement, un grand merci à Frédéric Breton, « précurseur » de la cassiicoline, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie tout particulièrement Valérie Pujade-Renaud, ma chef, qui m'a supportée pendant ces trois ans. Valérie, bien que j'étais réfractaire à l'idée de faire une thèse, tu as finalement réussi à me convaincre et je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. Ces trois années passées sous ton encadrement ont été très enrichissantes et surtout passionnantes. Je ne peux que saluer tes qualités scientifiques et humaines qui font de toi une encadrante hors pair.*

*Je remercie également Daniel Bieysse pour m'avoir co-encadrée. Daniel, merci d'avoir pris le temps de me former aux techniques de manipulation du champignon et d'avoir été si disponible tout le temps que j'ai passé à Montpellier. Je me rappellerai toujours des grosses séries d'inoculation à la chaine qui rythmaient nos semaines ainsi que des discussions très animées que nous avons eues autour de *Corynespora*. Merci pour toute l'aide que tu as apportée.*

*Merci à mes directeurs de thèse, Patricia Roeckel-Drevet et Thierry Leroy. Patricia, merci de t'être autant impliquée dans mon travail et d'avoir pris le temps de corriger mes divers manuscrits. Merci également pour ta compréhension, ton soutien...et la ballade à cheval dont je garde un bon souvenir.*

*Thierry, merci car malgré l'éloignement et un emploi du temps chargé, tu as toujours répondu présent à mes comités de thèse, ton regard extérieur ainsi que tes conseils avisés m'ont été d'une grande aide dans la réalisation de ce travail.*

*Je remercie Marc Seguin, Françoise Granet, Denis Tourvieille, Boris Fumanal, Philippe Simoneau et André Clément-Demange pour leur participation à mes comités de thèse et plus particulièrement Philippe Simoneau pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ainsi que pour ses conseils prodigués en matière de transformation du champignon.*

*Je tiens également à remercier Ana Scomparin pour son aide apportée sur la thématique endophyte.*

*Merci aussi à Ricardo Ribeiro Oliveira, de l'Université de Maringa, pour sa contribution à mes travaux, la confiance qu'il nous a témoigné en enrichissant notre collection de nouvelles souches brésiliennes et pour sa gentillesse. Même si au début on avait du mal à se comprendre on a fini par y arriver. Travailler à tes cotés a été très enrichissant.*

*Merci à Frédéric de Lamotte et Angélique Berger pour la purification de la cassiicoline, à Véronique Roussel pour son aide durant les manips d'inoculation et à François Bonnot pour les analyses statistiques. Je pense aussi à Gérald Oliver qui s'occupe si bien de la serre hévéa et à Stéphanie Gimenez qui a fourni une quantité de données d'inoculation assez impressionnante.*

*Je suis également très reconnaissante à Marc Seguin et Vincent Le Guen pour m'avoir accueillie dans leur bureau pendant les six premiers mois de ma thèse, pour tous ce qu'ils m'ont appris sur l'hévéa, pour leur soutien et leur gentillesse.*

*J'adresse un grand merci à tout le laboratoire PIAF et Jean Louis Julien pour leur accueil et pour leur contribution inestimable dans la réalisation de mes travaux de thèse. Plus particulièrement Jérôme et Sylvaine pour leur aide lors des grosses séries d'extraction, Aude pour son aide en statistique, Boris pour les analyses phylogénétiques, Rémi pour l'analyse des « faux » marqueurs microsatellites mais également tous les autres membres et ex-membres du PIAF : Nicole, Brigitte, Mélanie, Christelle, Stéphane, Jean Stéphane, Anaïs, Delphine, Nathalie, Catherine, Aurélie, David, Hosam, Ludo, Eric, Philippe ... pour l'ambiance sympathique et chaleureuse qui règne au laboratoire.*

*Merci à Norbert pour les dépannages informatiques express, mais aussi à JP et Laurent pour leur aide lorsque les chambres de culture et la serre se sont déglinguées.*

*Un immense merci à Aude, Eric, Julien, Julie, Olivia, Jérôme, Anaïs, David, Boris, Rémi et Ludo pour tous les moments qu'on a partagé ensemble, pour votre amitié et pour votre soutien. Mention spéciale pour Aude dont l'aide a été sans limite que ça soit au niveau scientifique ou humain.*

*Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement mes parents pour leur soutien et leurs encouragements et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, mes frères et sœurs parce que je les adore, mes grands parents, mais aussi mes cousines et mes tantes pour m'avoir permise de réaliser un rêve que je n'aurais pas cru possible...surtout durant ces trois années.*

*Enfin, mes derniers mots vont vers toi, Ayhan, tu me supportes et me soutiens depuis presque dix ans... Merci de m'avoir encouragée et soutenue tout au long de la rédaction de ce manuscrit, merci d'être là...*





## Liste des Abréviations

Act: Actine  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire  
AFLP: Amplified fragment length polymorphism  
ANOVA: Analyse de variance  
ARNm: Acide ribonucléique messenger  
Avr: Avirulence  
BS: Bootstrap  
Cas: Cassiicoline  
Cc: *Corynespora cassiicola*  
CDS: coding sequence  
CIRAD: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement  
CLF: Corynespora Leaf Fall  
DAMP: Damage associated molecular pattern  
dNTP: Désoxyribonucléosides Triphosphates  
dpi: days post-inoculation  
ESI-QTOF: Electrospray ionization-quadrupole –Time-of –Flight  
ETI: Effector-triggered immunity  
ETS: Effector-triggered susceptibility  
g: Gramme  
h: Heure  
Hb : *Hevea brasiliensis*  
HR: Hypersensitive response  
HSD: Honest significant difference  
HST: Host-Specific Toxin  
IFC: Institut Français du Caoutchouc  
ITS: Internal transcribed spacer  
kb: Kilobase  
kDa: Kilodalton  
L: litre  
LRR: Leucine rich repeat  
M: molaire  
MAMP: Microbe-associated molecular pattern  
MATAB: Mixed alkyl tri-methylammonium bromide  
MEA: Malt extract-agar  
min: Minutes  
ML: Maximum likelihood  
MP: Maximum parcimony

NBS: Nucleotide binding site  
NJ: Neighbor joining  
ORF: Open reading frame, phase de lecture ouverte  
PAMP: Pathogen-associated molecular pattern  
pb: paires de base  
Pb: *Pyrenophora bromi*  
PCR: Polymerase chain reaction  
PDA: Potato dextrose agar  
Pi: Phosphore inorganique  
pI: Point isoélectrique  
PL: Phylogenetic lineage  
PR: Pathogenesis-related  
PRR: Pattern recognition receptor  
Ptr: *Pyrenophora tritici-repentis*  
PVPP: Polyvinylpyrrolidone  
Qr: Quantité relative  
QTL: Quantitative trait locus  
RACE: Rapid amplification of cDNA ends  
RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism  
RLK: Receptor Like Kinase  
RLP: Receptor Like Protein  
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire  
ROS: Reactive oxygen species  
RPC: Reverse phase chromatography  
RT: Reverse transcription  
SALB: South American Leaf Blight  
SI: severity index  
SI<sub>L</sub>: severity index per leave  
SIPH: Société Internationale de Plantation d'Hévéa  
Sn: *Stagonospora nodorum*  
SNP : Single-nucleotide polymorphism  
SSP: Small secreted protein  
SSR: Simple sequence repeat  
TFA: acide trifluoroacétique  
T<sub>m</sub>: Température de fusion  
U: Unité enzymatique  
Ubi: Ubiquitine  
UV: ultraviolet

## Préface

*Hevea brasiliensis* est actuellement la principale source de caoutchouc naturel exploitée et commercialisée. Contrairement au caoutchouc synthétique, le caoutchouc naturel, possède des propriétés uniques dont une très grande résistance à l'étirement et à l'échauffement, qui en font un matériau précieux, notamment pour la fabrication des pneumatiques. L'industrie des pneumatiques consomme 65% de la production mondiale de caoutchouc naturel, le reste se répartissant entre la production de courroies, tuyaux, câbles, semelles, gants...Actuellement, la majeure partie du caoutchouc naturel est produit en Asie (93% de la production mondiale) et en Afrique (4%). La demande en caoutchouc naturel ne cessant d'augmenter, notamment suite au développement ces dernières années de pays émergents tel que la Chine ou l'Inde, de nombreuses activités de recherche ont été développées autour de l'hévéa principalement pour la sélection de clones à la fois hauts producteurs en latex et tolérants aux maladies. Outre la valeur agronomique des clones, la conduite d'exploitation et les conditions climatiques, un facteur majeur pouvant influencer la production de latex est l'impact de certaines maladies, en particulier les maladies foliaires. En effet, la synthèse de caoutchouc est étroitement liée à l'activité photosynthétique des feuilles. Des défoliations répétées affaiblissent l'arbre et impactent fortement la production. Une des maladies qui inquiètent le plus les planteurs d'hévéa actuellement est la « *Corynespora Leaf fall* » ou CLF. Le pathogène responsable de cette maladie est un champignon nécrotrophe appelé *Corynespora cassiicola*. Décrite pour la première fois en Inde en 1958, la maladie n'inquiéta pas car elle n'affectait que les jeunes plants en pépinière. A partir de 1975, plusieurs épidémies se succédèrent, d'abord en Asie puis en Afrique, touchant de plus en plus de cultivars de bonne valeur agronomique. En 1994, cette maladie fut enregistrée comme le 4<sup>ème</sup> problème majeur des plantations hévéicoles en termes de coûts financiers sur les sites d'expertise de l'IRRDB (Breton, 1997). De fortes attaques subies en 2010 ont contribué à renforcer l'inquiétude des planteurs

Actuellement, la gestion du problème consiste à éviter de planter les clones les plus sensibles et à traiter régulièrement les arbres avec des antifongiques. Cependant, ces traitement chimiques sont difficile à mettre en œuvre à l'échelle de la plantation, ont un coût élevé et sont néfastes pour l'environnement. Des observations en plantation ont montré que des clones décrits comme tolérants dans certains pays s'avéraient très sensibles dans d'autres (GT 1, PB 260, RRIM 600...) laissant supposer l'existence de races de *C. cassiicola* bien différenciées, avec des spectres d'hôtes distincts. De plus, la purification et la caractérisation d'une toxine, la cassiicoline, contribuant fortement à la pathogénicité de la souche qui la produit, est un premier pas vers la compréhension des mécanismes d'infection de *C. cassiicola*.

L'évolution ou la migration des populations de pathogènes fait craindre l'apparition d'épidémies sur des clones jusque-là épargnés. La sélection de clones résistants à l'ensemble des souches de *C. cassiicola* et/ou la mise-au-point de méthodes de lutte écologiques devient donc une nécessité. Néanmoins nos connaissances sur ce pathosystème sont très limitées et le développement de telles méthodes de lutte nécessite une meilleure connaissance de la biologie de *C. cassiicola* et de sa spécificité parasitaire.

Ce travail de thèse s'intègre totalement dans cette optique et répond aux demandes de l'Institut Français du Caoutchouc et du CIRAD qui ont cofinancé ce projet. Ce manuscrit s'organise en trois parties : une première partie introductive regroupant un état actuel des connaissances sur le pathosystème hévéa/ *C. cassiicola* ainsi qu'une partie traitant les interactions plantes/ champignons pathogènes d'un point de vue général. Ensuite seront présentés les objectifs de la thèse, puis les résultats sous forme d'articles : un premier article accepté dans Plant Science, un deuxième accepté dans Fungal Diversity et un troisième en préparation. Enfin une discussion générale clôturera ce manuscrit.

# TABLE DES MATIERES

<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE 1 .....</b>	<b>3</b>
<b>Le pathosystème hévéa/ <i>Corynespora cassiicola</i></b>	
<b>I. L'hévéa .....</b>	<b>5</b>
I. 1. Historique de l'hévéaculture .....	5
I. 2. L'hévéaculture en quelques chiffres .....	5
I. 3. L'hévéa : biologie et morphologie .....	7
I. 4. La production de caoutchouc .....	9
I. 4. 1. Anatomie du tronc .....	9
I. 4. 2. Le latex : cytoplasme des cellules laticifères.....	9
I. 4. 3. La saignée .....	11
I. 4. 4. Les pratiques culturales .....	11
I. 5. Les principales maladies de l'hévéa .....	13
I. 6. La lutte génétique .....	15
<b>II. La maladie Corynespora Leaf Fall (CLF) .....</b>	<b>16</b>
II. 1. Origine et incidence de la maladie .....	16
II. 2. Développement de la maladie .....	16
II. 3. Les méthodes de lutte contre <i>Corynespora cassiicola</i> .....	18
II. 4. Les symptômes de la maladie .....	18
<b>III. <i>Corynespora cassiicola</i> .....</b>	<b>19</b>
III. 1. Un champignon aux multiples facettes .....	19
III. 2. Processus infectieux chez l'hévéa .....	19
III. 3. Réactions de défense de l'hôte .....	21
III. 4. Mise en évidence d'une toxine : la cassiicoline .....	23
III. 5. Diversité de l'agent pathogène.....	25
<b>PARTIE 2 .....</b>	<b>29</b>
<b>Les interactions plantes/champignons</b>	
<b>I. Stratégies de nutrition des champignons .....</b>	<b>31</b>
<b>II. Les champignons phytopathogènes .....</b>	<b>33</b>
II. 1. Structures et stratégies de pénétration .....	33
II. 2. Les interactions plantes/champignons pathogènes .....	34
II. 2. 1. Interactions impliquant les PAMPs .....	34
II. 2. 2. Interactions impliquant des effecteurs .....	35
II. 2. 2. 1. L'Effector-Triggered Susceptibility (ETS) .....	36

<i>Les toxines non hôte-spécifiques</i> .....	39
<i>Les toxines hôte-spécifiques</i> .....	41
II. 2. 2. L'effector-Triggered Immunity (ETI) .....	45
II. 2. 3. L'évitement ou la suppression de l'ETI .....	47
II. 2. 4. Les modèles d'interaction effecteur/récepteur .....	49
II. 2. 5. Translocation des effecteurs dans la cellule hôte .....	50
II. 2. 6. Structures des protéines de résistance et de sensibilité .....	52
 OBJECTIFS .....	 55
 CHAPITRE 1 .....	 59
Characterization of a cassiicolin-encoding gene from <i>Corynespora cassiicola</i> , pathogen of rubber tree ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	
 CHAPITRE 2 .....	 75
First characterization of endophytic <i>Corynespora cassiicola</i> isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil	
Résultats complémentaires .....	97
 CHAPITRE 3 .....	 101
Evolutionary history and pathogenicity of <i>Corynespora cassiicola</i> with a special emphasis on <i>Hevea brasiliensis</i>	
 DISCUSSION GENERALE .....	 129
I. La cassiicoline, effecteur de la CLF chez l'hévéa ? .....	131
II. Sensibilité des clones à la cassiicoline : une interaction « gène-pour-gène » ? ....	135
III. Diversité des gènes de cassiicoline et pathogénie .....	141
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	 145
I. Conclusions .....	147
II. Perspectives .....	148
II. 1. Rôle de la cassiicoline dans la pathogénie chez l'hévéa .....	148
II. 2. Quelles perspectives pour le contrôle de la maladie ? .....	148
 ANNEXE .....	 151
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	 155

# *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*





## **PARTIE 1**

### *Le pathosystème hévéa / *Corynespora cassicola**



## I. L'hévéa

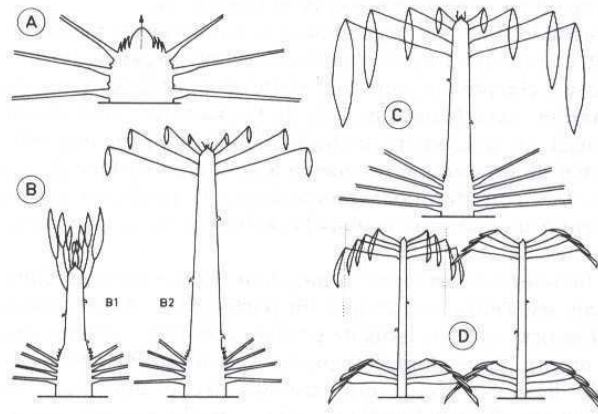
L'hévéa (*Hevea brasiliensis*), ou arbre à caoutchouc, appartient à la famille des euphorbiacées qui regroupe des espèces herbacées ou ligneuses dont la caractéristique commune est la présence de latex dans les tissus phloémiens. Dix espèces d'hévéa sont décrites à ce jour : *H. benthamiana*, *H. brasiliensis*, *H. camporum*, *H. guianensis*, *H. microphylla*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. rigidifolia*, *H. spruceana* et *H. camargoana*. Toutes produisent du latex mais seule *H. brasiliensis* est cultivée pour la qualité et la quantité du latex qu'elle produit.

### I. 1. Historique de l'hévéaculture

L'hévéa est originaire du bassin amazonien et plus particulièrement du Brésil (Mato Grosso, Para). L'essor de l'industrie du caoutchouc débute au début du 19<sup>ème</sup> siècle en Europe avec la découverte de la mastication (modelage) par Hancock et de l'imperméabilisation des tissus par Mackintosh. Cependant, le caoutchouc naturel issu du latex d'hévéa présente alors deux défauts majeurs : il est cassant par temps froid et collant au soleil. C'est en 1839 que Goodyear découvre par hasard le processus de vulcanisation qui consiste à chauffer le latex en présence de soufre. Ce procédé de stabilisation du matériau va alors révolutionner l'usage de ce polymère et intensifier l'exploitation des hévéas sauvages en Amérique du Sud. Jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle, l'essentiel de la production mondiale de latex est obtenue en Amazonie Brésilienne. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, la production de latex se déplace en Asie et en Afrique. C'est l'anglais Henri Wickham qui, en 1876, collecte des graines au Brésil et les envoie au jardin botanique de Kew en Angleterre. En 1877, 22 plants provenant de Kew sont envoyés au jardin botanique de Singapour. La forte augmentation des prix du caoutchouc amazonien va conduire l'Angleterre et la Hollande à développer l'hévéaculture de plantation dans leurs colonies Asiatiques, entraînant alors la ruine de l'économie de cueillette des hévéas en Amazonie.

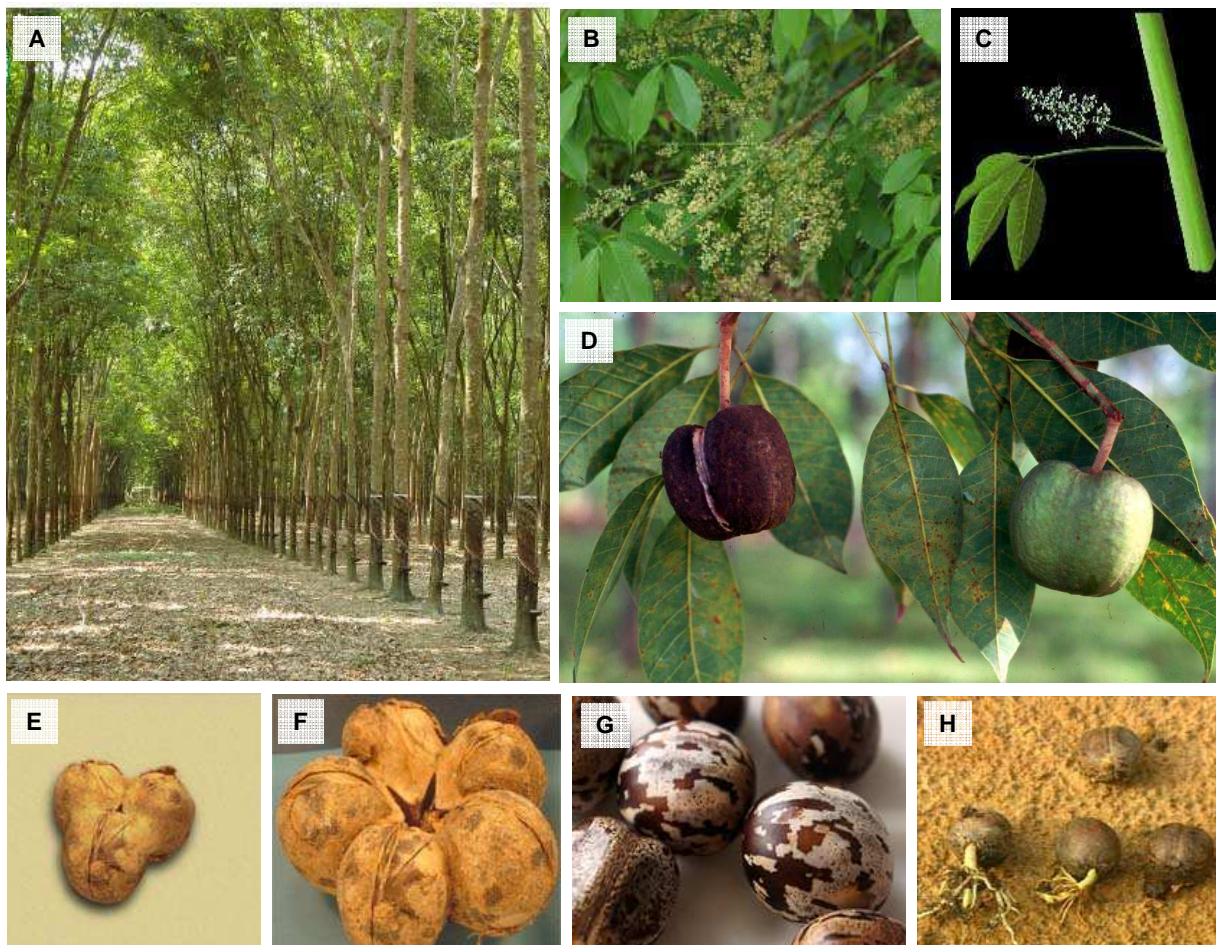
### I. 2. L'hévéaculture en quelques chiffres

Actuellement, l'essentiel de la production mondiale de caoutchouc naturel est assurée par l'Asie (93%). Le reste de la production se répartit entre l'Afrique (4%) et l'Amérique Latine (3%) (*Rubber Statistical Bulletin, October-December 2011 edition*). La faible part de l'Amérique latine dans la production s'explique principalement par la présence d'un agent pathogène foliaire de l'hévéa, le champignon *Microcyclus ulei*, qui a empêché le développement d'une hévéaculture rentable sur le continent américain. L'hévéaculture a une importance socio-économique considérable. En moyenne, 10 millions de tonnes de caoutchouc sont produites chaque année dans le monde. En Asie, l'hévéaculture fournit un revenu pour 30 millions d'habitants soit 1% de la population asiatique totale. L'hévéaculture a aussi un impact écologique très favorable grâce à la forte capacité de fixation du carbone des hévéas. Il a été rapporté par exemple (Cheng et al. 2007) que les plantations d'hévéa en Chine ont un potentiel de fixation du carbone (272 tonnes/ha/30 ans) supérieur à celui des forêts primaire (234.305 t/ha/30 ans) et secondaire (150.203 t/ha/30 ans).



**Figure 1 : Stades foliaires de l'hévéa au cours du développement d'une unité de croissance d'après Hallé & Martin (1968).**

Stade A : Débourrement ; Stade B : Croissance ; Stade C : Maturation ; Stade D : Dormance



**Figure 2 : L'*Hévéa brasiliensis*** (<http://www.afd.be>)

A : Plantation d'hévéa au Vietnam ; B et C : Inflorescences d'hévéa ; D, E et F : Fruits d'hévéa ; G et H : Graines d'hévéa.

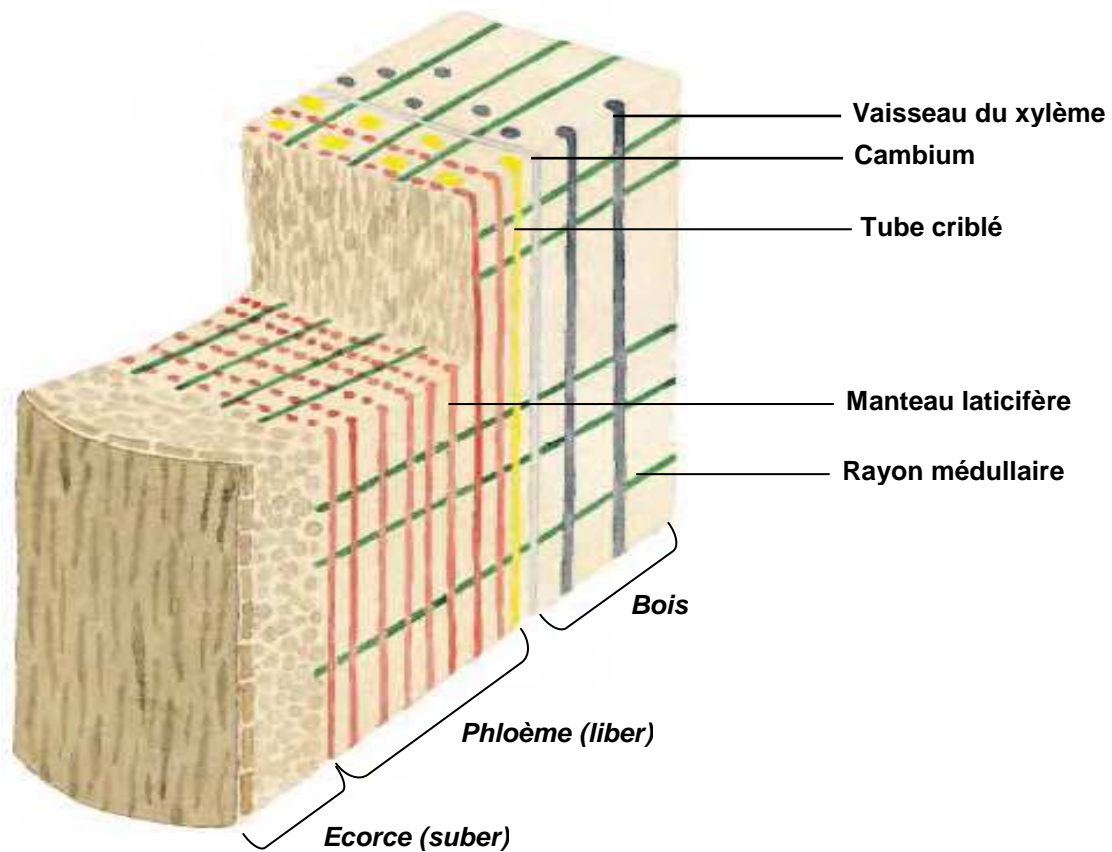
### **I. 3. L'hévéa : biologie et morphologie**

L'hévéa est un arbre qui, à l'état sauvage, peut atteindre plus de 30 mètres de hauteur, avec un tronc de trois mètres de diamètre. Il est phénologiquement immature jusqu'à six ou sept ans. Lors de cette période, il émet des étages de croissance toutes les six semaines environ, tout au long de l'année. Lorsqu'il atteint sa maturité phénologique, son cycle de croissance devient annuel avec une période de défoliation en saison sèche permettant le remplacement des vieilles feuilles. Les feuilles sont composées de trois folioles disposées à l'extrémité d'un long pétiole. Le cycle de développement d'une unité de croissance s'effectue en quatre stades foliaires successifs (Hallé and Martin 1968b) (Fig. 1):

- Stade A : **Débourrement**. Le bourgeon terminal, composé des feuilles préformées, s'ouvre et la nouvelle unité de croissance apparaît.
- Stade B : **Croissance**. Les entre-nœuds s'allongent et de petites feuilles anthocyaniques (pigment rougeâtre) apparaissent. Progressivement les limbes se renversent et les pigments disparaissent.
- Stade C : **Maturation**. Les feuilles s'accroissent ; elles sont toujours pendantes, flasques et de couleur vert clair.
- Stade D : **Dormance**. Les feuilles se durcissent et se redressent.

Le système racinaire est composé d'un pivot à partir duquel partent de longues racines latérales. L'ensemble du pivot et des racines latérales assure à l'arbre un solide ancrage dans le sol. Le pivot permet à l'arbre d'aller trouver de l'eau très profondément dans le sol surtout pendant la saison sèche. Les racines latérales, très ramifiées, assurent la plus grande part de l'absorption des éléments minéraux.

L'hévéa est un arbre monoïque. Les inflorescences, en racèmes, se développent à l'aisselle des feuilles (Fig. 2). Les fleurs mâles, très nombreuses, garnissent l'intérieur du racème alors que les fleurs femelles se développent à l'extrémité des axes primaires et secondaires de l'inflorescence. La floraison, déclenchée par une forte intensité lumineuse, peut survenir une à deux fois par an (Yeang 2007). La pollinisation est principalement entomophile mais peut aussi être anémophile. C'est un arbre préférentiellement allogame (fécondation croisée), le fruit est une capsule contenant généralement trois graines qui, à maturité (environ cinq mois après la floraison), sont libérées au moment de la déhiscence (Fig. 2).



**Figure 3 : Anatomie du tronc d'un hévéa mature.**

Vaisseaux du xylème (noir) ; Cambium (gris) ; Tubes criblés (jaune) ; Manteaux laticifères (rouge) ; Rayons médullaires (vert).

## **I. 4. La production de caoutchouc**

### **I. 4. 1. Anatomie du tronc**

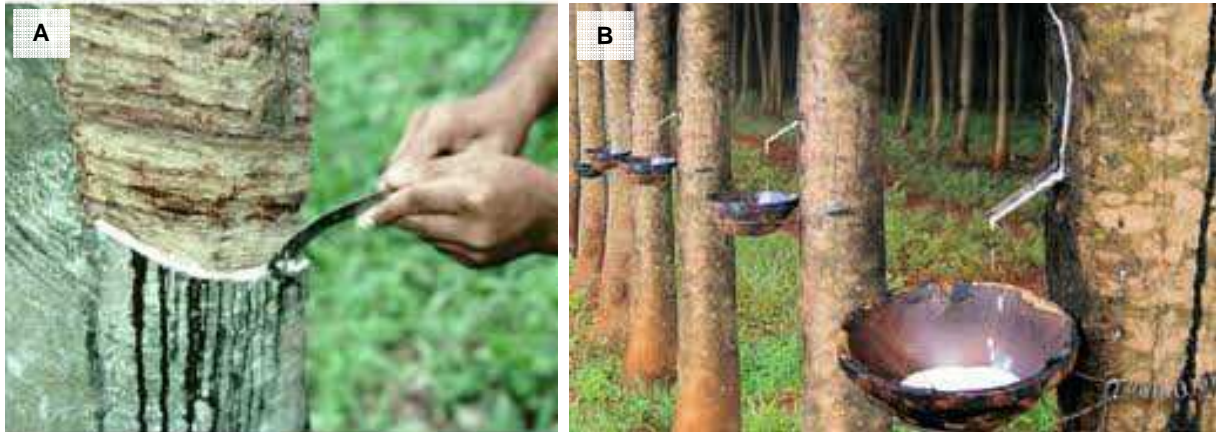
Le cambium, méristème secondaire, assure la croissance en épaisseur de l'arbre en produisant des cellules qui se différencient vers l'intérieur pour donner le bois et les vaisseaux conducteurs de la sève brute (xylème) contenant l'eau et les sels minéraux provenant de la racine qui sont acheminés jusqu'aux feuilles. Le cambium produit également des cellules qui se différencient vers l'extérieur pour donner le phloème (liber), dont les cellules laticifères. Ces cellules spécialisées, siège de la synthèse du caoutchouc, sont émises en couches monocellulaires successives appelées manteaux laticifères (Fig. 3). Les cellules d'un même manteau sont anastomosées entre elles, formant un continuum cytoplasmique des racines jusqu'aux feuilles. Intercalés entre le cambium et les premières couches de cellules laticifères se trouvent les tubes criblés conducteurs de la sève élaborée (phloème) qui véhiculent les produits de la photosynthèse des feuilles. Des rayons médullaires, du fait de leur orientation horizontale, assurent les échanges entre le liber et le bois (minéraux, sucres...).

### **I. 4. 2. Le latex : cytoplasme des cellules laticifères**

Le latex, cytoplasme des cellules laticifères, contient tous les organites cellulaires classiques ainsi que des organites spécifiques tels que les particules de caoutchouc, les lutoïdes ou les particules de Frey-wyssling. Les particules de caoutchouc (cis-1,4-polyisoprène) sont enveloppées d'une fine enveloppe phospholipoprotéique chargée négativement (Gomez and Moir 1979). Cette charge électrique permet le maintien en suspension dans le cytosol des particules de caoutchouc, par répulsion électrostatique. Les lutoïdes sont des vésicules vacuolaires entourées d'une membrane semi-perméable chargée négativement. Ces organites sont riches en protéines dont de nombreuses enzymes qui peuvent altérer la stabilité du latex lorsqu'elles sont libérées dans le cytoplasme (d'Auzac 1982). Enfin, les particules de Frey-Wyssling sont des plastes modifiés renfermant de nombreuses inclusions lipidiques riches en caroténoïdes (Frey-Wissling 1932; Gomez 1976).

La synthèse du caoutchouc commence dans le cytosol des cellules laticifères à partir de sucres qui sont métabolisés en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate ainsi formé est ensuite converti en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase dans les mitochondries (cycle de Krebs). L'acétyl-CoA est le précurseur du cis-polyisoprène (caoutchouc) (d'Auzac 1965; Archer and Cockbain 1969). La production de latex est donc très fortement dépendante de l'activité photosynthétique des feuilles qui fournit le carbone nécessaire à la synthèse des sucres. Une alimentation en sucres importante est nécessaire pour assurer la glycolyse et permettre la synthèse et/ou la régénération du latex entre deux saignées.





**Figure 4 : La saignée**

La saignée se fait à l'aide d'un couteau de saignée et consiste en une incision de l'écorce qui permet la section des manteaux laticifères et donc l'expulsion de latex (A) (<http://www.cintel.com>). Le latex s'écoule le long de l'encoche jusqu'à une tasse (B) (<http://www.journaldunet.com>).

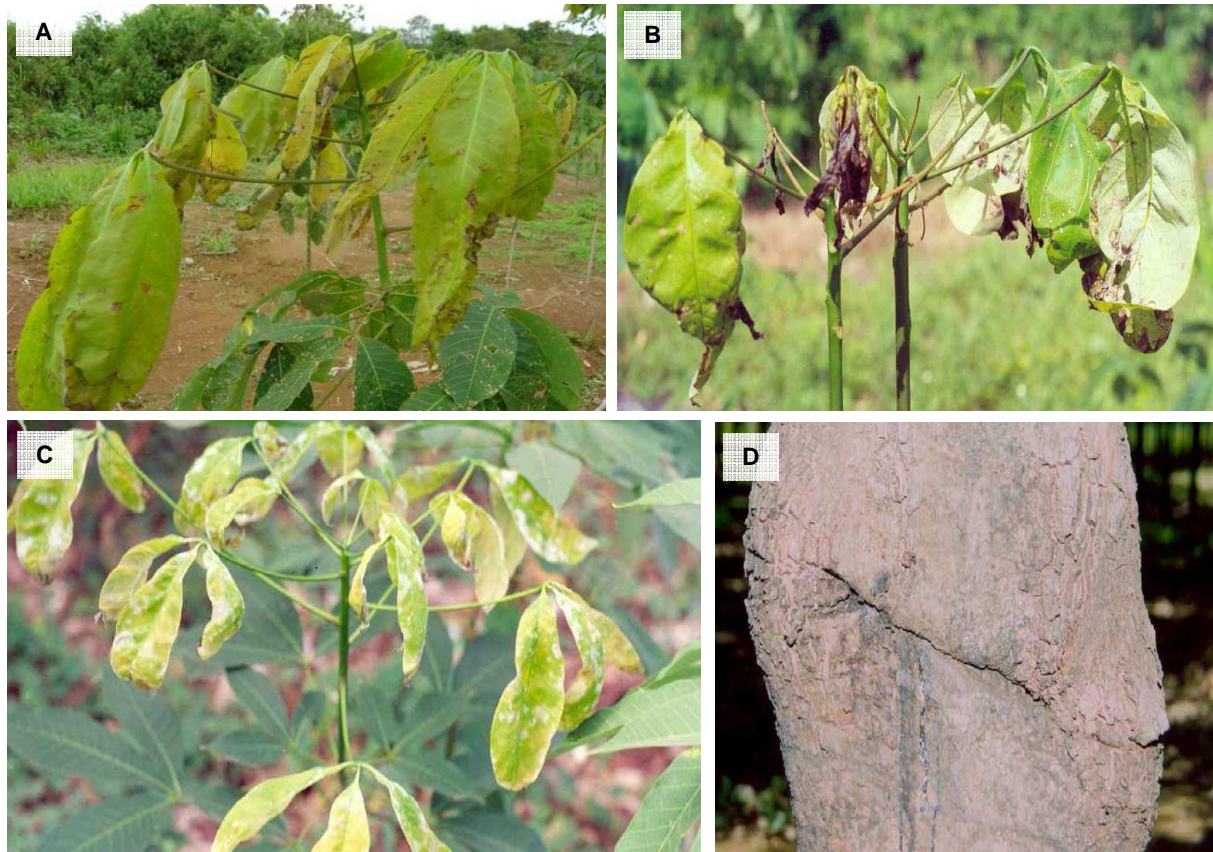
### **I. 4. 3. La saignée**

La récolte du latex se fait par incision de l'écorce sur quelques millimètres, le plus souvent en demi-spirale descendante, à l'aide d'un couteau de saignée (Fig. 4A). Une fine couche d'écorce est alors éliminée. Cette incision doit sectionner les manteaux laticifères mais sans endommager le cambium qui permet la régénération des tissus. Sous l'effet de la pression de turgescence, le latex est expulsé et s'écoule ensuite le long d'une gouttière jusqu'à une tasse, drainant en partie le manteau laticifère (Fig. 4B). La pression de turgescence étant maximale pendant la nuit (stomates ouverts), les meilleurs rendements de latex sont obtenus par des saignées nocturnes. Au bout d'un moment, l'écoulement du latex s'arrête. Les particules de caoutchouc coagulent et forment un bouchon refermant la blessure. Cette coagulation est due à des modifications de charge des particules de caoutchouc induites par l'éclatement des lutoïdes. Ce sont les contraintes physiques appliquées au niveau de l'encoche de saignée qui provoquent un déchirement des lutoïdes, libérant ainsi des éléments (cations, facteurs de coagulations...) induisant des phénomènes de coalescence des particules de caoutchouc (Gidrol et al. 1994; d'Auzac et al. 1995; Delabarre and Serier 1995). Les noyaux et mitochondries sont maintenus à l'intérieur des cellules laticifères lors de l'écoulement du latex et permettent ainsi la régénération du contenu cellulaire, en compensation du latex expulsé.

L'utilité des cellules laticifères pour la plante est encore mal connue. Etant donné qu'après la saignée, il y a coagulation du latex au niveau de l'encoche de saignée, le latex est supposé intervenir dans les mécanismes de défense en colmatant les zones de blessure induites par les attaques de prédateurs et en les protégeant contre les invasions parasitaires. Les lutoïdes sont très riches en hydrolases, comprenant des chitinases et glucanases connues pour leurs rôles au sein des mécanismes de défense contre les agents pathogènes (d'Auzac et al. 1995). De nombreux travaux ont été réalisés sur une petite protéine, l'hévéine, qui représenterait 50 à 70% des protéines solubles des lutoïdes (Archer et al. 1969). Cette protéine aurait un rôle de défense contre les agents pathogènes plus particulièrement les champignons et participerait à la coagulation des particules de caoutchouc (Van Parijs et al. 1991; Gidrol et al. 1994; Lee and Raikhel 1995).

### **I. 4. 4. Les pratiques culturales**

Les arbres sont saignés pour la première fois lorsque la circonférence des troncs à un mètre du sol atteint environ 50 cm, soit vers cinq ou six ans suivant les cultivars. Ils seront exploités en continu durant une trentaine d'années, avec cependant des périodes de repos de quelques semaines allant de la chute des feuilles à la refoliation (généralement saison sèche). Dans la majorité des plantations, la saignée est pratiquée tous les trois ou quatre jours, en demi-spirale descendante. Lorsque toute l'écorce du premier panneau de saignée a été consommée, le panneau opposé est ouvert à son tour. Des traitements à base d'éthéphon, un générateur d'éthylène, peuvent être pratiqués pour stimuler la production de latex (Abraham et al. 1968; d'Auzac and Ribaillier 1969). Au bout d'une trentaine d'années, les arbres sont abattus et valorisés sous forme de bois, pour l'ameublement.



**Figure 5 : Symptômes engendrés par différents champignons pathogènes de l'hévéa.**

A : *Microcyclus ulei* responsable de la « South American Leaf Blight » (SALB) (Le Guen 2008) ; B : *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de l'antracnose ; C : *Oïdium heveae* responsable de l'oïdium ; D : *Phytophthora palmivora* responsable de la maladie des raies noires (<http://www.docstoc.com>, R&D for rubber industry in Vietnam)

Les variétés cultivées en plantation sont des clones obtenus par greffage sur des porte-greffes issus de graines. Des génotypes élités, sélectionnés pour leurs qualités agronomiques, peuvent ainsi être multipliés. Dans une parcelle dite « monoclonale », toutes les parties aériennes (tronc et couronne) sont donc génétiquement homogènes, mais le système racinaire, issu de graines, reste hétérogène.

Actuellement, les maladies foliaires constituent un des facteurs limitant de la production de latex. En effet, la production de latex est très fortement dépendante de l'activité photosynthétique des feuilles qui fournit le carbone nécessaire à la synthèse des sucres indispensables au métabolisme des cellules laticifères.

## **I. 5. Les principales maladies de l'hévéa**

Les principales maladies de l'hévéa sont causées par des champignons. Ces derniers peuvent entraîner, selon l'importance des épidémies, des pertes de rendement importantes et même conduire à la mort de l'arbre dans les cas les plus extrêmes. Toutes les strates de l'hévéa peuvent être affectées, depuis les racines jusqu'aux feuilles. Les principales maladies cryptogamiques de l'hévéa sont présentées ci-dessous (Compagnon 1986; Breton 1997; Garcia 1997):

### **Les maladies foliaires :**

*Microcyclus ulei* provoque la maladie sud américaine des feuilles ou SALB (South American Leaf Blight) (Fig. 5A). Il sévit exclusivement en Amérique centrale et du sud où il limite considérablement le développement de l'hévéaculture, alors qu'il s'agit de l'aire d'origine de l'hévéa. Ce parasite fait peser une grande menace sur l'hévéaculture mondiale car les clones cultivés en Asie et en Afrique sont extrêmement sensibles à la maladie (clones wickham).

*Corynespora cassiicola* qui entraîne la maladie « *Corynespora Leaf Fall* » (CLF) attaque l'ensemble des feuilles jeunes et matures. Initialement restreint aux pépinières, il s'est rapidement propagé dans les plantations d'Asie et d'Afrique entraînant des épidémies sporadiques parfois sévères. Aucune épidémie n'a été signalée en Amérique latine jusqu'à présent. La rapidité d'infection et de propagation de cet agent pathogène inquiète de plus en plus les planteurs. En 1994, cette maladie fut enregistrée comme le 4<sup>ème</sup> problème majeur des plantations hévéicoles en termes de coûts financiers sur les sites d'expertise de l'IRRDB (International Rubber Research and Development Board) (Breton 1997). Aujourd'hui, c'est l'une des plus importantes dans les zones de production d'Afrique et d'Asie.

*Colletotrichum gloeosporioides* est responsable de l'anthracnose des feuilles qui sévit dans toutes les zones d'hévéaculture mais qui entraînerait davantage de dégâts dans les plantations africaines (Fig. 5B).

*Oidium heveae*, responsable de l'oïdium, est rencontré dans tous les pays hévéicoles d'Asie (Fig. 5C).

*Heminthosporium hevea* (ou *Dreschlera hevea*), est responsable de la maladie appelée « Bird's eyes spot », caractérisée par une multitude de petites nécroses circulaires. Cette maladie reste cependant peu développée.

### **Les maladies de panneau :**

*Phytophthora palmivora* sévit sur toutes les parties aériennes de l'arbre et notamment au niveau des panneaux de saignée entraînant la maladie dite des raies noires (« Black Stripes ») (Fig 5D). Ce champignon est présent surtout en Asie où il peut provoquer d'importants dégâts.

Une maladie qu'il est important de citer, bien qu'elle ne soit pas cryptogamique, est celle de l'encoche sèche. Elle se traduit par des nécroses au niveau des panneaux de saignée entraînant un arrêt partiel ou total de la production de latex. Aucun agent pathogène associé à cette maladie n'a pu être mis en évidence. Ce phénomène d'encoche sèche, qui apparaît souvent à la jonction entre le porte-greffe et le greffon, serait dû à des dérèglements physiologiques causés/accrûs par la surexploitation chez certains clones sensibles. La sensibilité clonale à l'encoche sèche suit un gradient identique à celui de l'activité métabolique des clones. Elle est corrélée positivement à la fréquence de stimulation de l'arbre à l'Ethrel (éthylène sous forme liquide). Les clones peu sensibles supportent mieux la stimulation à l'Ethrel à l'opposé des clones très sensibles (Okoma et al. 2009).

### **Les maladies racinaires :**

D'autres maladies sévissant au niveau des racines, les « pourridiés », sont extrêmement graves et très répandues en Afrique. Les agents pathogènes les plus rencontrés sont *Fomes lignosus* et *F. noxius*. Les contaminations et les infections ayant lieu sous la surface du sol, les symptômes ne peuvent être visibles qu'après une infection déjà très avancée et conduisent très régulièrement à la mort de l'arbre (Compagnon 1986).

### **Les méthodes de lutte :**

Les méthodes de lutttes utilisables contre les champignons pathogènes de l'hévéa restent assez limitées. En ce qui concerne les maladies foliaires, elles sont assez bien contrôlées en pépinière par l'application de fongicides. Cependant, en plantation, ce genre de traitement est difficile à mettre en œuvre et se révèle très couteux aussi bien au niveau financier qu'au niveau écologique. Les fongicides ne sont utilisés qu'en cas de forte attaque, par pulvérisation aérienne des feuilles. La réceptivité des feuilles aux agents pathogènes est en générale maximum lors du débourrement des jeunes feuilles. Une autre méthode de lutte est l'application de produits défoliants (éthylène) qui permettent d'avancer la défoliation naturelle de l'hévéa afin d'obtenir la refoliation lorsque la pluviométrie est encore faible, c'est-à-dire en période peu favorable à la dissémination et à la contamination de l'hévéa par ces champignons (Guyot et al. 2001). Cette méthode a été appliquée avec un certain succès dans le cas de l'antracnose en Afrique, ou du SALB en Amérique latine, mais elle reste très coûteuse. Dans le cas du *Phytophthora*, le fongicide est appliqué sur le panneau de saignée après la saignée, en période de risque (saison des pluies). Dans le cas des pourridiés, il est nécessaire d'excaver en partie les racines pour pouvoir appliquer le fongicide.

## **I. 6. La lutte génétique**

L'amélioration génétique de l'hévéa a pour objectif la création de clones à la fois hauts producteurs en latex et plus tolérants aux principales maladies. La cartographie génétique moléculaire de l'hévéa a été développée dans ce but, au moyen de marqueurs AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment length Polymorphism*) et microsatellites (SSR, *Simple Sequence Repeats*) et appliquée avec succès à l'analyse du déterminisme génétique de la résistance au SALB (Lepinasse et al. 2000a; Lepinasse et al. 2000b; Le Guen et al. 2003; Le Guen 2008).

La première évaluation du déterminisme génétique de la résistance de l'hévéa au SALB a été réalisée par un travail de cartographie de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) réalisé sur une population F1 issue du croisement entre un clone d'*H. brasiliensis* sensible au SALB et haut producteur en latex (PB 260) et un clone résistant peu productif, issu de l'hybridation interspécifique entre *H. brasiliensis* et *H. benthamiana* (RO 38), en conditions d'inoculations contrôlées (Lepinasse et al. 2000a) et en conditions naturelles d'infestation (Le Guen et al. 2003).

Suite à la découverte de nouvelles souches de *M. ulei* capables de contourner la résistance totale de RO 38, une nouvelle source de résistance a été exploitée (Mattos et al. 2003). Il s'agit de celle du clone MDF 180, provenant d'une population d'hévéas sauvages du Pérou, qui présente une résistance partielle caractérisée par une faible voir moyenne intensité de sporulation conidienne mais sans développement de la phase sexuée du champignon qui n'a jamais été observée quelque soit l'inoculum utilisé. Cette résistance partielle serait non spécifique du fait de son efficacité vis-à-vis de l'ensemble des souches testées (Le Guen 2008). L'analyse du déterminisme génétique de cette résistance à partir du croisement entre les clones PB 260 (sensible) et MDF 180 (résistant) a permis d'identifier deux gènes majeurs, chacun d'eux expliquant la résistance à un inoculum donné auxquels viennent s'ajouter les effets d'un à trois QTLs mineurs (Le Guen 2008). Du fait de la durabilité de la résistance de ce clone, ces gènes majeurs ouvrent de nouvelles perspectives en matière de création variétale de clones qui soient à la fois haut producteurs et résistants au SALB par sélection assistée par marqueurs.

Cette stratégie pourrait être envisagée afin de mieux comprendre le déterminisme de la résistance/sensibilité des clones d'hévéa à la CLF et créer des outils d'aide à la sélection d'individus tolérants.

## II. La maladie *Corynespora* Leaf Fall (CLF)

### II. 1. Origine et incidence de la maladie

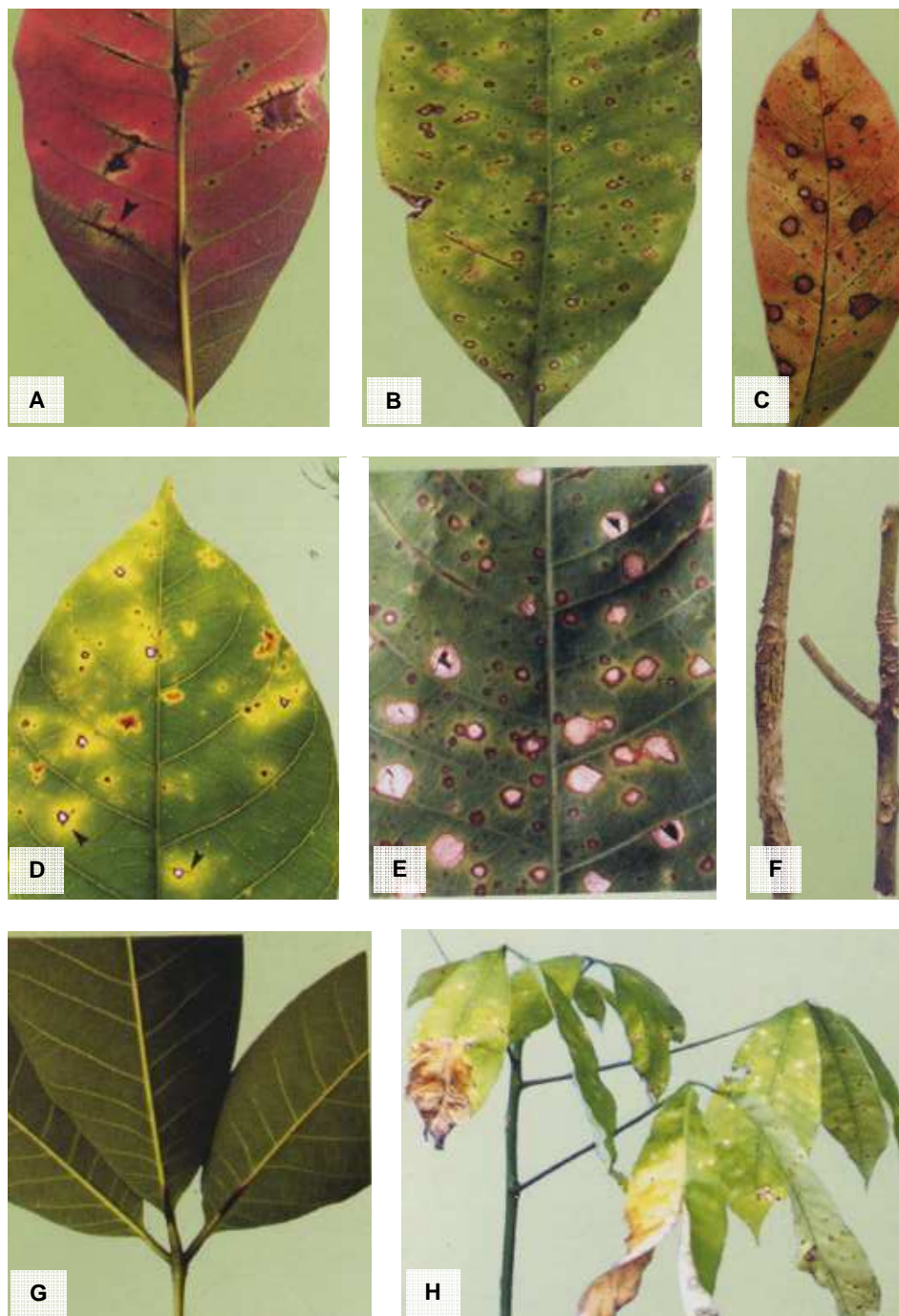
Cette maladie a été observée pour la première fois en Inde en 1958 (Ramakrishnan and Pillay 1961), puis en Malaisie (1960) (Newsam 1960). Elle s'est ensuite rapidement propagée à tous les pays producteurs d'Asie et d'Afrique : Nigeria (1969) (Awoderu 1969), Indonésie (1980) (Teoh 1983), Brésil (Junqueira et al. 1985), Sri Lanka, Cameroun (Liyanage et al. 1986a), Thaïlande (1985) (Pongthep 1987), Bangladesh (Rahman 1988), Vietnam (1998) (Dung and Hoan 1999) et enfin très récemment en Chine (2006) (Jinji et al. 2007). Au début, *Corynespora cassiicola* était considéré comme un agent pathogène mineur de l'hévéa et sa présence était limitée aux jeunes plants en pépinières. Cette maladie prit des proportions épidémiques en 1975 quand, pour la première fois, elle toucha deux très bons clones en Malaisie (RRIC 103 et RRIM 725). A partir de 1980, d'autres pays d'Asie du Sud-Est furent fortement touchés par des épidémies de CLF entraînant l'arrachage de clones les plus sensibles sur des milliers d'hectares en Malaisie, Indonésie, Thaïlande et Sri Lanka. Ce fut ensuite au tour des pays africains de pâtir de la maladie à la fin des années 1980, avec un clone particulièrement sensible : l'IRCA 18. A partir de 1995 plusieurs clones de très bonne valeur agronomique très largement plantés dans le monde (RRIM 600, GT 1, RRIC 110 et RRIM 105), considérés jusque là comme résistants ou tolérants aux épidémies de CLF qui sévirent au milieu des années 1980, furent fortement atteints par la maladie (Jayasinghe 2000, 2003).

### II. 2. Développement de la maladie

Les spores sont produites à partir de 8h du matin pour atteindre un pic de production à midi et enfin diminuer jusqu'en début de soirée (Okhuoya 1986; Chee 1988; Purwantara and Pawirosoemardjo 1991). Une étude a été réalisée afin de tenter de mettre en évidence l'effet des saisons sur la production des conidies. Cependant, les importantes variations observées d'une année sur l'autre n'ont pas permis d'établir un profil annuel type. Une période sèche favoriserait la dissémination des conidies dans l'air et une certaine humidité serait indispensable à la germination et à la pénétration de l'agent pathogène dans l'hôte (Radzia et al. 1996).

Au Nigéria, les pics d'épidémies se produisent à la fois en saisons sèches et humides. Ceci s'expliquerait par le fait qu'en saison des pluies, l'humidité générée par les pluies favoriserait la sporulation et la germination des spores. Etant donné qu'à cette période les arbres sont en pleine refoliation, ils sont très sensibles à la maladie. Durant la saison sèche, c'est l'humidité matinale (humidité relative 80%, même en saison sèche) qui stimulerait la sporulation et la germination des spores, leur dissémination se faisant aux heures plus sèches (Okhuoya 1986).





**Figure 6 : Différents types de symptômes engendrés par *C. cassicola* sur hévéa.**

A : lésions caractéristiques en « arête de poisson » ; B : lésions d'aspect similaire à celles causées par *Heminthosporium heveae* (Bird's eye spot) ; C : lésions d'aspect similaire à celles causées par *Colletotrichum gloeosporioides* (anthracnose) ; D : lésions irrégulières et polyédriques associées à des chloroses importantes ; E : lésions d'aspect similaire à celles causées par *Oïdium heveae* (Oïdium) ; F : Noircissement et déchirure de l'écorce des tiges ; G : Noircissement des pétioles ; H : Sévère infection d'un jeune plant ressemblant à une attaque de *C. gloeosporioides*.



### **II. 3. Les méthodes de lutte contre *Corynespora cassiicola***

La méthode la plus courante est l'utilisation de fongicides dont la formulation varie en fonction des régions ou pays. Même s'ils permettent de limiter la maladie en pépinière, leur utilisation en plantation est limitée aux attaques sévères compte-tenu de leur coût et de leur impact néfaste sur l'environnement. Par ailleurs, aucun traitement fongicide n'apparaît totalement efficace. Il existe également des méthodes de lutte préventives comme l'éradication des hôtes intermédiaires (soja, papaye...) dans le voisinage des plantations ou en cultures intercalaires. En effet, il a été montré que des isolats prélevés de ces derniers étaient capables d'infecter l'hévéa (Sinulingga et al. 1996). Egalement, l'utilisation d'abris permettant un ombrage partiel des pépinières diminue l'incidence de la maladie (Rajalakshmy and Kothandaraman 1996). La méthode radicale la plus utilisée suite aux différentes épidémies de CLF a été l'arrachage des clones les plus sensibles et leur remplacement par des clones plus tolérants. La sélection de matériel génétique présentant une certaine résistance à *C. cassiicola* est une nécessité (Jayasinghe and Silva 1996).

### **II. 4. Les symptômes de la maladie**

Le diagnostic de la maladie en plantation est très difficile compte tenu de la grande diversité des symptômes. Les symptômes les plus communément rencontrés sont caractérisés par des lésions foliaires brunes avec une décoloration progressive des tissus périphériques associées à un noircissement des nervures adjacentes aux lésions donnant un aspect caractéristique en « arêtes de poisson » à la maladie (Fig. 6A) (Jayasinghe 2000). Cependant les lésions peuvent prendre d'autres aspects. Elles peuvent être circulaires brunes présentant en leur centre un aspect cartonneux légèrement blanchâtre et associées à une légère chlorose périphérique (Fig. 6B). Certaines sont plutôt irrégulières, en cercles concentriques ressemblant aux symptômes de l'anthracnose provoqués par *Colletotrichum gloeosporioides* (Fig. 6C), d'autres sont plutôt polyédriques avec une chlorose périphérique très importante (Fig. 6D). Des symptômes ressemblant à ceux causés par *Oïdium heveae* ont également été observés. Ils sont caractérisés par des lésions irrégulières brunes ayant un aspect cartonneux (Fig. 6E). Dans certains cas, les symptômes sont assez discrets et seul un noircissement de la base des nervures centrales est observé (Fig. 6G). Selon l'importance de la maladie, les feuilles peuvent jaunir entièrement, se dessécher puis tomber (Fig. 6H). Les infections sur les tiges et les pétioles conduisent à une déchirure de l'écorce et à la mort des organes (Fig. 6F) (Garcia 1997).

### III. *Corynespora cassiicola*

#### III. 1. Un champignon aux multiples facettes

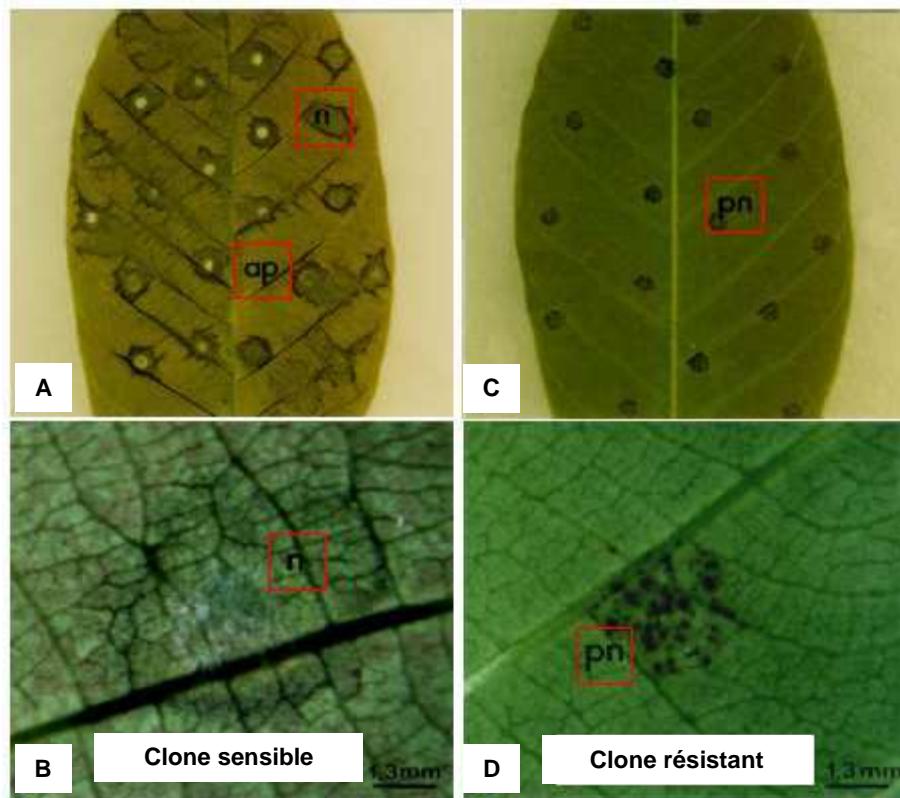
*Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) est un champignon ascomycète imparfait qui appartient aux dothideomycètes et forme, avec *Corynespora smithii*, un clade phylogénétique distinct parmi les pléosporaceae (Schoch et al. 2009). Il a été trouvé dans les feuilles, tiges, fruits et racines de plus de 300 espèces de plantes principalement dans les régions tropicales et subtropicales mais également en serres dans les régions tempérées (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>; (Farr and Rossman 2011). Ce champignon a également été trouvé sur la peau humaine entraînant des mycoses (Huang et al. 2009).

Principalement décrit comme pathogène, il cause d'importants dégâts sur de nombreuses plantes d'intérêt économique telles que l'hévéa, la tomate, le concombre, le coton ou encore le soja (Chee 1990; Lakshmanan et al. 1990; Koenning et al. 2006; Oliveira et al. 2006; Oliveira et al. 2007; Schlub et al. 2009). Des isolats de *C. cassiicola* ont également été obtenus à partir de matériel végétal sain, traduisant sa capacité à vivre en tant qu'endophyte, chez *Quercus ilex* (Collado et al. 1999), *Aegle marmelos* (Gond et al. 2007), *Magnolia liliifera* (Promputtha et al. 2007) ainsi que d'autres plantes des forêts tropicales (Suryanarayanan et al. 2002; Suryanarayanan et al. 2011). Un comportement saprophyte a également été observé sur concombres, tomates, papayes (Kingsland 1985b), *Bambusa spp* et *Dendrocalamus spp* (Hyde et al. 2001), *Ischyrolepis subverticella* (Lee et al. 2004) et *Magnolia liliifera* (Promputtha et al. 2007; Promputtha et al. 2010). De nombreuses autres plantes peuvent abriter *C. cassiicola* en tant qu'agent pathogène, endophyte ou saprophyte (Dixon et al. 2009). Chez l'hévéa, *C. cassiicola* est exclusivement connu en tant qu'agent pathogène nécrotrophe.

#### III. 2. Processus infectieux chez l'hévéa

Dans de nombreuses interactions hôte/parasite, le processus d'infection, regroupant la germination des spores à la surface de l'hôte puis la pénétration du parasite à l'intérieur de l'hôte, fait intervenir des signaux de nature chimique présents à la surface des tissus colonisés (feuille, tige, racine...).

Une étude comparative réalisée sur clones résistant ou sensible (GT 1 et PB 260) à *C. cassiicola* a pu mettre en évidence qu'il n'y avait aucune différence entre le taux de germination des conidies sur ces deux clones suggérant l'absence de mécanismes de défense induits susceptibles d'inhiber la germination des conidies à la surface des feuilles du clone résistant (Breton 1997). La germination des conidies à la surface des feuilles est assez précoce et importante. Il a été montré, après inoculation de suspension conidienne sur feuilles d'hévéa, que le taux de germination atteignait 95% en 6h.



**Figure 7 : Macro-symptômes engendrés par inoculation de suspension de spores de *C. cassicola* (souche CCP) sur les clones sensible PB 260 (A et B) et résistant GT 1 (C et D), 72 h après infection.**

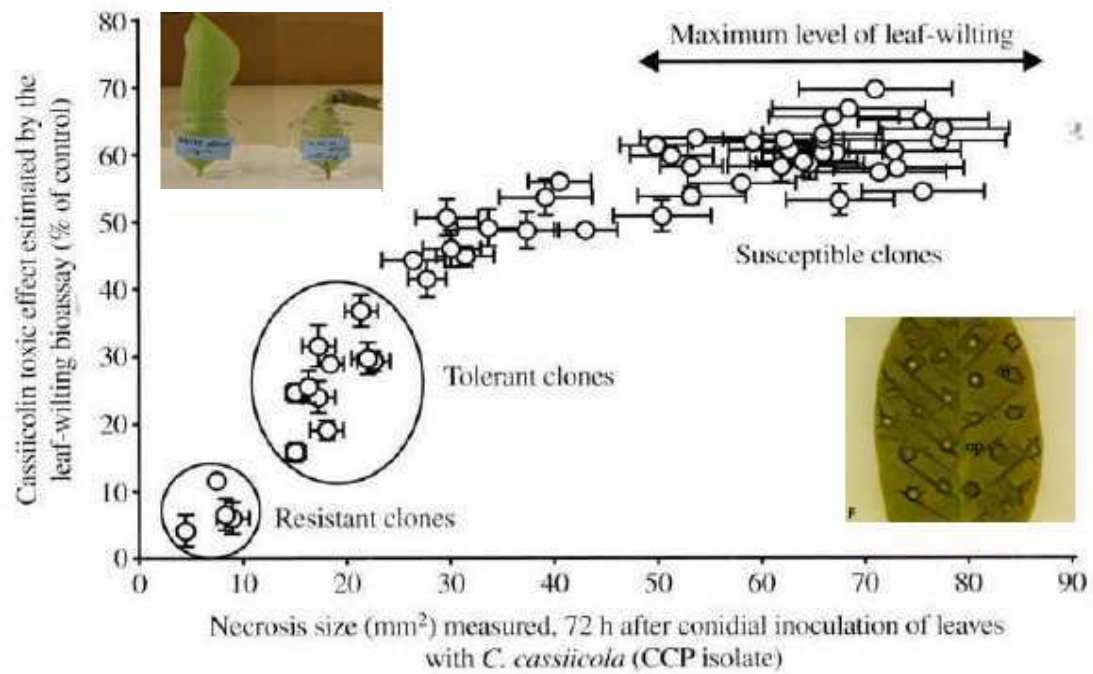
n : nécrose ; ap : arête de poisson ; pn : points nécrotiques  
(Breton et al. 1997a)

Les spores produisent un ou plusieurs tubes germinatifs à leurs extrémités (Chee 1988). Des observations en microscopie à balayage du processus d'infection de *C. cassicola* ont permis de montrer, qu'après la germination des conidies, les hyphes mycéliens sécrètent une matrice extracellulaire de nature fibrillaire dense sur toute leur périphérie. Cette dernière assurerait l'adhésion du mycélium à la surface des feuilles et pourrait jouer un rôle dans le processus de pénétration du champignon dans les tissus hôtes. En effet, les matrices extracellulaires sont souvent associées à des activités hydrolytiques (cutinases, pectinases...) facilitant la pénétration des hyphes mycéliens à travers la cuticule et les parois cellulaires. La pénétration des hyphes de *C. cassicola* se faisant principalement au travers de la cuticule et seulement très rarement par les stomates, le rôle hydrolytique de cette matrice fibrillaire est fort probable. Lors de la pénétration, les hyphes ne différencient pas d'appressorium. Seul un léger renflement a pu être observé. Après pénétration, le mycélium progresse de manière intracellulaire. Chez le clone sensible, l'invasion des tissus est associée à la mort d'un grand nombre de cellules. A l'inverse, chez le résistant, seules quelques cellules autour du site de pénétration sont touchées (Breton et al. 1997a). Les premiers symptômes de la maladie apparaissent très rapidement après inoculation de spores (entre 24h et 48h) quelle que soit la sensibilité du clone infecté. Ceci est corrélé à la précocité et au fort taux de germination des conidies (95% en 6h) (Chee 1988).

### **III. 3. Réactions de défense de l'hôte**

Au niveau histologique, les lésions foliaires montrent de nettes différences entre clones sensible (PB 260) et résistant (GT 1). Chez le clone sensible, les lésions sont assez étendues (Fig 7A et B) le mycélium envahit toutes les couches cellulaires entraînant leur mort. Une dégénérescence se manifestant par la condensation des noyaux est également observée pour les cellules autour de la lésion alors qu'elles ne sont pas colonisées par le mycélium. Ceci appuie l'hypothèse de l'existence d'une toxine sécrétée par le champignon. A l'inverse, les lésions du clone résistant sont ponctiformes (Fig 7C et D), le mycélium est bloqué dès les premières assises cellulaires. Une accumulation de composés bruns dans les nervures des cellules nécrotiques est également observée, autour du site d'infection (Breton et al. 1997a).

Au niveau biochimique, deux composants partiellement corrélés aux mécanismes de défense ont été étudiés. Il y a tout d'abord l'accumulation d'une phytoalexine, la scopolétine, et plus tardivement la lignification des parois créant une barrière physique à la propagation du champignon. Une étude menée sur un clone sensible (PB 260) et un clone résistant (GT 1) a montré que, chez le clone résistant, la production et l'accumulation de scopolétine est trop lente et trop faible pour expliquer la résistance à *C. cassicola* (Breton et al. 1997b). La teneur en protéines des feuilles, liée au niveau de dégénérescence des tissus, reste stable chez le clone résistant alors qu'elle chute fortement chez le clone sensible indiquant un fort niveau de dégradation des tissus (Breton et al. 1997b).



**Figure 8 : Corrélation entre la sensibilité d'une cinquantaine de clones d'hévéa à la cassicoline semi-purifiée et au champignon (souche CCP).**

Chaque point représente un clone d'hévéa.  $R^2 = 0,822$

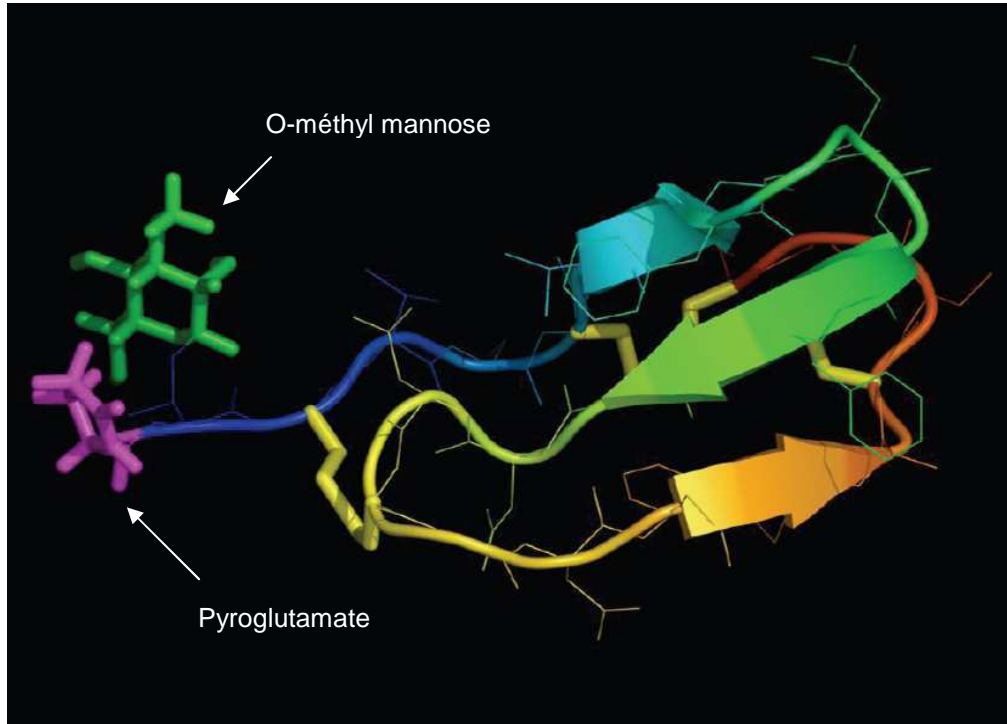
(Breton et al. 2000)

Les cinétiques d'accumulation de deux PR-protéines (Pathogenesis Related Proteins), la chitinase et la  $\beta$  1,3 glucanase, ne permettent pas non plus d'expliquer les différences de sensibilité/résistance entre les deux clones. Par contre, les activités peroxydases (gaïacol-oxydase, syringaldazine-oxydase et peroxydase NAD(P)H dépendante), communément impliquées dans les mécanismes de défense, sont significativement supérieures chez le clone résistant par rapport au sensible (Breton et al. 1997a; Breton et al. 1997b). Comme nous l'avons vu précédemment, chez le clone résistant, après pénétration, le mycélium est rapidement stoppé et reste bloqué dans les tissus nécrotiques au point de pénétration. La lignification des parois, semblant être associée à l'augmentation des activités peroxydases, n'a pu être observée que trop tardivement pour pouvoir expliquer ce blocage précoce du mycélium. Par contre, le blocage du mycélium pourrait être expliqué par la réticulation des protéines pariétales (d'Auzac 1996).

A l'heure actuelle, les mécanismes de défense connus ne permettent pas d'expliquer la résistance précoce du clone résistant. D'autres paramètres mesurables qui interviennent très tôt dans les interactions hôte/agent pathogène sont la production par l'hôte de formes actives de l'oxygène (pic oxydatif). Elles peuvent intervenir soit dans les réactions de type hypersensible conduisant à une mort cellulaire programmée et à un arrêt immédiat de l'attaque, soit dans la mise en place de mécanismes de défense plus ou moins efficaces chez l'hôte (d'Auzac 1996). Parmi ces formes réactives de l'oxygène, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont les formes les plus souvent étudiées dans les interactions hôte/agent pathogène. La cinétique de production du peroxyde d'hydrogène est très souvent utilisée pour distinguer les réactions de type hypersensible des réactions incompatibles (Dixon et al. 1994). Généralement, le premier pic d' $H_2O_2$ , qui est produit dès le premier contact entre l'éliciteur et le récepteur sur la cellule hôte, est commun aux réactions compatibles et incompatibles alors que l'apparition d'un second pic plus tardif serait caractéristique de la réaction hypersensible. Cette cinétique a été étudiée lors de l'interaction du clone résistant GT 1 avec *C. cassicola* mettant en évidence un seul pic d' $H_2O_2$  ce qui traduirait donc l'absence de réaction hypersensible chez le résistant face à l'infection par *C. cassicola* (Breton 1997).

### **III. 4. Mise en évidence d'une toxine : la cassiicoline**

Plusieurs travaux concomitants ont suggéré la présence d'une toxine excrétée par *C. cassicola* dans des milieux de culture liquide (Onesirosan et al. 1975; Sarma and nayudu 1975). Plus tard, des observations histologiques réalisées sur le clone sensible PB 260 après inoculation conidienne ont appuyé l'existence de cette toxine car il est apparu que de très nombreuses cellules étaient dégénérantes bien au delà du front de développement du mycélium. Des tests de phytotoxicité du milieu de culture liquide du champignon (souche CCP) sur feuilles d'une cinquantaine de clones d'hévéa ont été réalisés parallèlement à des tests d'inoculation. Ces tests ont mis en évidence une corrélation positive entre la sensibilité des clones au champignon (estimée par la taille des nécroses) et leur sensibilité au filtrat de culture (% de flétrissement) (Breton 1997).



**Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la cassiicoline.**  
(Barthe et al. 2007)

Ces tests ont par la suite été réitérés en utilisant non plus le filtrat de culture du champignon mais de la cassiicoline semi-purifiée (Fig. 8) (Breton et al. 2000). Une corrélation positive entre la sensibilité des clones au champignon et la cassiicoline semi-purifiée a également été montrée mettant ainsi en évidence le rôle primordial de la cassiicoline dans la pathogénie de la souche qui la produit (CCP). Par ailleurs, des inoculations sur feuilles de clone sensible (PB 260) réalisées avec une suspension conidienne de *C. cassiicola* (CCP) additionnée d'anticorps anti-cassiicoline ont révélé une diminution importante des symptômes par rapport au témoin inoculé sans anticorps (Breton et al. 2000). Ces expériences démontrent le rôle déterminant de la cassiicoline pour la pathogénie de *C. cassiicola* sur l'hévéa.

Le procédé de purification établi par de Lamotte et al (2007) a permis l'obtention de cassiicoline ultra pure en quantité suffisante pour finaliser le séquençage de la protéine et caractériser sa structure tridimensionnelle par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Il a ainsi pu être montré que la cassiicoline est une petite glycoprotéine de 2884,96 Da composée de 27 acides aminés seulement et repliée selon une structure stabilisée par trois ponts disulfures. Elle présente un pyroglutamate à son extrémité N-terminale et un groupement O-méthyl mannose sur le deuxième acide aminé (Fig. 9) (Barthe et al. 2007).

L'application de toxine purifiée sur feuilles a montré que la toxine reproduit les symptômes foliaires observés après inoculation par une suspension conidienne du champignon, que ce soit à l'échelle tissulaire ou au niveau de l'ultra-structure cellulaire (Barthe et al. 2007). De plus, le spectre d'hôtes de la toxine, testé sur différentes espèces végétales et sur différents cultivars d'hévéa, se superpose exactement à celui du champignon (Barthe et al. 2007). Ces résultats suggèrent que la cassiicoline pourrait être une nouvelle toxine hôte-sélective (HST : Host Selective Toxin) (Breton et al. 2000; Barthe et al. 2007).

### **III. 5. Diversité de l'agent pathogène**

Il existe une grande diversité morphologique et physiologique des souches de *C. cassiicola*. Des différences de couleur du mycélium (beige à gris foncé) mais également de couleur du milieu de culture ont été observées, ainsi que des différences de texture, forme (rondes à légèrement polygonales) et croissance des colonies mycéliennes en culture *in vitro* (Chee 1988; Nghia et al. 2008; Fernando et al. 2009; Qi et al. 2011).

Ce champignon présente aussi une grande variabilité dans la capacité des souches à produire des conidies (Chee 1988). Ces dernières peuvent également avoir une morphologie très variable (longueur, largeur, nombre de pseudoseptates, forme cylindrique, incurvée...) que ce soit au sein d'une même souche ou pour des souches différentes (Nghia et al. 2008; Qi et al. 2011). Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la diversité morphologique et la diversité du pouvoir pathogène. En ce qui concerne la pathogénie, il a été montré que pour une souche donnée, l'intensité des symptômes de la maladie est variable en fonction des clones d'hévéa infectés. Certains sont résistants tandis que d'autres présentent divers degrés de sensibilité ou tolérance à la maladie.



	Inde	Malaisie	Indonésie	Afrique	Thaïlande	Sri Lanka	Vietnam
<b>Avros 2037</b>			1				
<b>GT 1</b>		3 - 4	3 - 4	1	3 - 4	1	2
<b>PB 260</b>		2	2	3 - 4	1	1	2
<b>RRIM 600</b>		3 - 4	3 - 4				1
<b>PB 235</b>		2	2		1		1
<b>PR 107</b>	2 - 3	2 - 3					
<b>PB 217</b>	2	2	2			1	
<b>RRIC 110</b>		3 - 4	3 - 4		3 - 4	4	
<b>IAN 873</b>		4	4				
<b>RRII 105</b>	3 - 4						
<b>PR 261</b>			2				

**Tableau 1 : Comportement en plantation de plusieurs clones commerciaux face à la CLF en fonction des pays (inoculum naturel).**

(1 : résistant ; 2 : tolérant ; 3 : sensible ; 4 : très sensible)

(Jayasinghe 2003)

A l'inverse, pour un clone d'hévéa donné, l'intensité des symptômes fluctue en fonction des souches inoculées qui peuvent être plus ou moins agressives (Silva et al. 1998; Ismail and Jeyanayagi 1999; Breton et al. 2000; Nghia et al. 2008; Qi et al. 2009; Qi et al. 2011).

En 2003, Jayasinghe publie une liste de clones décrivant leur sensibilité/tolérance à la maladie CLF en fonction des pays (Tableau 1) (Jayasinghe 2003). Par exemple, le clone GT 1 est considéré comme très sensible en Malaisie, Indonésie, Thaïlande et relativement résistant en Afrique et au Sri Lanka. Quant au clone PB 260, il serait tolérant en Malaisie et Indonésie, très sensible en Afrique et résistant en Thaïlande et Sri Lanka. Cette variabilité de comportement des clones a donc soulevé l'hypothèse de l'existence de races de *C. cassiicola* avec des spectres d'hôtes bien distincts.

En ce qui concerne la diversité génétique de cet agent pathogène, de nombreuses études ont été réalisées à l'aide de différents types de marqueurs moléculaires. La technique de « Randomly Amplified Polymorphic DNA » (RAPD) a souvent été employée, révélant un certain polymorphisme parmi des isolats de *C. cassiicola*. Certaines études révèlent une corrélation entre les groupes RAPD mis en évidence et les caractéristiques des isolats (pathogénie, origine géographique, clone de collecte) (Silva et al. 1998; Atan and Hamid 2003; Silva et al. 2003) alors que d'autres n'établissent aucune corrélation (Darmono et al. 1996; Romruensukharom et al. 2005). Cependant la technique RAPD a l'inconvénient d'être faiblement reproductible, ce qui pourrait expliquer la divergence de ces résultats. Plus récemment, la technique « Inter Simple Sequence Repeat » (ISSR) a été appliquée pour étudier la diversité d'une collection d'isolats de *C. cassiicola* prélevés dans différentes régions de Malaisie (Nghia et al. 2008). Cette étude a révélé que 91,5% des bandes générées étaient polymorphes reflétant la forte diversité génétique des isolats. Ces isolats ont ensuite pu être classés en deux clusters. Des travaux antérieurs, réalisés sur des souches provenant de Malaisie, avait pu mettre en évidence deux races de l'agent pathogène sur la base des différences de pouvoir pathogène et de préférences clonales chez l'hévéa (Ismail and Jeyanayagi 1999). Afin d'explorer l'existence de races dans leurs isolats, Nghia et al (2008) ont réalisé des inoculations sur feuilles détachées en utilisant les mêmes clones qui avaient servi à la discrimination des deux races de Ismail et Jeyanayagi (1999). Ils ont ainsi pu confirmer l'existence de deux races distinctes de *C. cassiicola* présentant des différences en termes de préférences clonales. L'analyse moléculaire ISSR couplée aux résultats d'inoculations a ainsi pu révéler que les souches identifiées comme appartenant à la race 1 faisaient partie du cluster 1 et celles identifiées comme appartenant à la race 2 faisaient partie du cluster 2. Cependant, il faudrait inclure dans ces analyses un grand nombre d'autres souches et clones d'hévéa pour pouvoir confirmer cette corrélation entre les races et leurs appartenances à des groupes génétiques. Des travaux réalisés avec des souches pathogènes chinoises n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation entre les clusters ISSR et l'appartenance de ces souches aux races 1 et 2 (Qi et al. 2009).



## ***PARTIE 2***

### ***Les interactions plantes / champignons***



## **I. Stratégies de nutrition des champignons**

Les champignons, contrairement aux plantes, sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Ils sont donc incapables de synthétiser leurs propres ressources carbonées et doivent les extraire à partir de composés organiques préexistants. Face à cette contrainte majeure, ils ont développé différentes stratégies de nutrition : le saprophytisme, la symbiose et le parasitisme.

Les champignons saprophytes : Ils se développent sur les débris végétaux en décomposition dont ils se nourrissent (souches de bois mort, feuilles mortes). Ils possèdent de nombreuses enzymes permettant la dégradation de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine et peuvent être responsables de différents types de pourritures en fonction du degré de dégradation de la lignine: la pourriture blanche (dégradation totale), la pourriture molle (dégradation partielle) et la pourriture brune (modification chimique). Les champignons saprophytes jouent un rôle majeur dans les écosystèmes forestiers car ils contribuent au recyclage de la matière organique la rendant de nouveau assimilable par d'autres organismes.

Les champignons symbiotiques (Duhoux and Nicole 2004) : Ils établissent avec les végétaux une interaction mutuellement bénéfique. Une première catégorie de champignons symbiotiques s'associent aux végétaux par la formation au niveau des racines d'organes mixtes appelés mycorhizes. On distingue deux types de mycorhizes: les endo- et les ectomycorhizes. Les associations endomycorhiziennes sont les plus répandues car elles concernent 80% des espèces végétales. Les champignons responsables de cette symbiose sont des symbiotes obligatoires qui dépendent entièrement de leur hôte pour leur nutrition et leur cycle de développement. Leurs hyphes pénètrent les cellules épidermiques racinaires (traversant la paroi) et produisent des vésicules inter et intracellulaire dans l'épiderme et l'exoderme ainsi que des arbuscules dans les cellules corticales (par invagination des membranes plasmiques). Les arbuscules ont un rôle dans le transfert des nutriments entre les partenaires, et les vésicules auraient un rôle de stockage des réserves et de propagation du champignon. Le développement intra-racinaire du mycélium est accompagné par un développement extra-racinaire qui conduit à la sporulation. Les symbioses ectomycorhiziennes concernent majoritairement les plantes ligneuses comme le sapin, le mélèze, le pin, le hêtre ou le chêne. Les champignons ectomycorhiziens colonisent le sol jusqu'aux racines des arbres autour desquelles ils développent trois structures : un réseau intercellulaire entre les cellules de l'assise pilifère et les premières cellules du cortex, un manteau très dense qui enveloppe la racine et des filaments extra-matriciels qui explorent le sol afin d'assurer la nutrition minérale et qui sont également reliées aux fructifications du champignon. Quel que soit le type de mycorhize, la plante fournit le champignon en ressources carbonées qui en retour lui apporte une meilleure alimentation hydrique et minérale (Lehto and Zwiazek 2011; Miransari 2011; Smith and Smith 2011, 2012). Les plantes mycorhizées seraient également plus tolérantes à divers stress biotiques et abiotiques (Whipps 2004; Dalpé 2005; Li et al. 2006; Aroca et al. 2007).

D'autres champignons symbiotiques, appelés endophytes, peuvent coloniser les plantes sans développer de structures particulières. Ces champignons vivent entièrement à l'intérieur des tissus végétaux et se retrouvent aussi bien dans les parties aériennes que les parties souterraines des plantes hôtes. Les endophytes semblent jouer un rôle bénéfique dans la tolérance de leur hôte à différents stress biotiques et abiotiques. Par exemple, il a été démontré que certains endophytes conféraient à leur hôte une meilleure résistance aux attaques d'insectes et d'herbivores notamment par la production de composés toxiques (Powell and Petroski 1992; Bush et al. 1997; Rodriguez et al. 2009). D'autres protégeraient leur hôte face à certaines maladies. C'est le cas d'*Epichloë festucae* qui augmente la résistance de son hôte face aux champignons pathogènes foliaires *Sclerotinia homeocarpa* et *Laetisaria fusiformis* (Bonos et al. 2005; Clarke et al. 2006). Les endophytes constituent une ressource très intéressante pour la lutte biologique (Arnold et al. 2003; Rodriguez et al. 2009). Cependant, dans certaines circonstances, une colonisation trop importante de l'hôte peut entraîner un affaiblissement de la plante. En effet, lorsque le coût de la symbiose est plus important que les bénéfices apportés, la relation tend vers le parasitisme (Wäli et al. 2006; Rodriguez et al. 2009).

Les champignons parasites ou pathogènes : Les champignons sont dits parasites lorsqu'ils se développent au détriment de leurs hôtes, entraînant même dans certains cas la mort de leur hôte. Les champignons pathogènes sont présents dans tous les taxons et leurs hôtes peuvent être très variés. Leur incidence est importante tant d'un point de vue économique que d'un point de vue environnemental compte tenu de la multiplicité des traitements phytosanitaires. Les champignons pathogènes des plantes (ou phytopathogènes) peuvent être classés en trois groupes selon leur stratégie de nutrition : les nécrotrophes, les biotrophes et les hémibiotrophes. Les champignons nécrotrophes tuent les cellules végétales en aval de leur développement puis colonisent les tissus mort à la manière des saprophytes. Les champignons biotrophes, à l'inverse des nécrotrophes, se développent dans les tissus vivants de leur hôte en détournant une partie des nutriments. Leur développement et leur propagation dépend entièrement de l'intégrité des cellules végétales colonisées, ce sont des parasites obligatoires. Ces agents pathogènes ont généralement un spectre d'hôte très limité. Il existe cependant des champignons qui présentent une combinaison de ces différents styles de vie et stratégies de nutrition. Ces agents pathogènes peuvent développer une phase initiale transitoire de biotrophie puis devenir nécrotrophes, on les appelle les hémibiotrophes.

Il est important de noter que de nombreux champignons sont des parasites facultatifs qui peuvent adopter différentes stratégies de nutrition. En effet, de nombreuses espèces reconnues pathogènes sont régulièrement isolées en tant qu'endophytes (Kumar and Hyde 2004; Photita et al. 2004; Photita et al. 2005). De plus, plusieurs souches isolées en tant qu'endophytes ont été trouvées pathogènes lorsqu'elles étaient ré-inoculées sur leur hôte d'origine (Mostert et al. 2000; Photita et al. 2004; Dixon et al. 2009; Lana et al. 2011). D'autres études appuient l'hypothèse que les endophytes peuvent devenir saprophytes à la sénescence de l'hôte (Promputtha et al. 2002; Promputtha et al. 2007; Okane et al. 2008; Porras-Alfaro and Bayman 2008; Promputtha et al. 2010).

Les parties qui suivent seront dédiées exclusivement aux interactions plantes/agents pathogènes afin de mieux comprendre dans quel contexte s'ancre notre pathosystème.

## II. Les champignons phytopathogènes

### II. 1. Structures et stratégies de pénétration

Une étape primordiale dans le développement des champignons pathogènes est la pénétration de l'hôte. Les spores en germination sécrètent de nombreux composés impliqués dans l'adhésion à la surface de l'hôte ainsi que de nombreuses enzymes de dégradation favorisant la pénétration et la colonisation. La pénétration peut s'opérer directement à travers la cuticule de la plante *via* des structures d'infection spécialisées plus ou moins bien différenciées appelées appressoria ou alors s'effectuer à travers les stomates. Les appressoria permettent à l'agent pathogène de pénétrer l'hôte en utilisant une combinaison de force mécanique et d'enzymes de dégradation des parois (Howard et al. 1991; Pryce-Jones et al. 1999; Tucker and Talbot 2001; Chen et al. 2004).

Une fois passée la barrière de la cuticule et de la paroi, les champignons biotrophes et hémibiotrophes, comme *Blumeria graminis* et *Melampsora lini*, peuvent développer à l'intérieur des cellules de leur hôte des structures très spécialisées appelées haustoria, vraisemblablement impliquées dans la nutrition et dans la sécrétion de divers effecteurs. Ces structures sont formées par invagination de la membrane plasmique à l'intérieur des cellules de l'hôte. L'haustorium apparaît jouer un rôle clé dans le maintien de la biotrophie au niveau de l'acquisition des nutriments (Voegelé et al. 2001; Voegelé and Mendgen 2010). Il jouerait également un rôle important au niveau de la sécrétion de nombreux effecteurs protéiques pouvant interférer avec la mise en place des défenses de l'hôte. Cependant, son rôle dans la sécrétion n'a pas été clairement démontré. D'autres champignons comme *Magnaporthe oryzae* se développent de manière intracellulaire par l'intermédiaire d'hyphes d'infection spécialisés qui invaginent la membrane plasmique de la cellule infectée (Kankanala et al. 2007). Lors d'une interaction compatible, les hyphes infectieux différencient des structures lobées (bulbes) dans lesquelles on retrouve de nombreux effecteurs protéiques (Khang et al. 2010). Certains champignons, comme *Cladosporium fulvum*, ne différencient pas de structure particulière mais développent un hyphe infectieux à la surface de la feuille qui va pénétrer par les stomates et continuer sa croissance dans l'espace intercellulaire du mésophylle où il trouve ses nutriments (Thomma et al. 2005). *Claviceps purpurea*, responsable de l'ergot du seigle, colonise son hôte de manière intra- et inter-cellulaire (Tudzynski and Scheffer 2004). Les hyphes intracellulaires résultent de l'invagination des membranes plasmiques de l'hôte. Ils sont donc également entourés par la membrane plasmique de la plante et pourraient avoir des fonctions haustoriales (Tudzynski and Scheffer 2004).

Les champignons nécrotrophes ne développent pas de structures particulières à l'intérieur de l'hôte. Après la pénétration des hyphes par les stomates ou au travers la cuticule grâce à des appressoria plus ou moins bien différenciés, de nombreuses enzymes de dégradation des parois et toxines sont sécrétées afin de tuer les cellules permettant ainsi le développement et la colonisation de l'hôte (Oliver and Ipcho 2004).



Le séquençage et l'analyse des génomes de différents champignons ont permis de montrer que les champignons nécrotrophes et hémibiotrophes possédaient de nombreux gènes codant pour des enzymes de dégradation des parois (cellulose, xylane, pectine, mannane) comparativement aux biotrophes obligatoires. *Gibberella zeae* et *Magnaporthe oryzae*, qui sont des champignons hémibiotrophes, possèdent respectivement 151 et 156 gènes codant pour des enzymes de dégradation des parois. Les champignons nécrotrophes *Sclerotinia sclerotinium*, *Botrytis cinerea* et *Pyrenophora teres f. teres* en possèdent respectivement 106, 118 et 145. Comparativement, les agents biotrophes *Blumeria graminis* et *Ustilago maydis* présentent seulement 10 et 33 enzymes de dégradation respectivement dans leur génome (Kämper et al. 2006; Amselem et al. 2011). L'analyse des transcriptomes de *S. sclerotinium* et *B. cinerea* lors d'une infection a permis de mettre en évidence une régulation positive significative de 40 et 43 gènes respectivement codant pour diverses enzymes de dégradation (cellulose, xylane, pectine, mannane) (Amselem et al. 2011).

## **II. 2. Les interactions plantes/champignons pathogènes**

Lors de l'interaction entre une plante et un agent pathogène, une étape importante est la perception de l'agent pathogène par la plante. Il est maintenant largement admis que les plantes répondent à une infection par un système immunitaire à deux niveaux de reconnaissance (Jones and Dangl 2006). Le premier niveau correspond à une reconnaissance « non spécifique » et fait intervenir des éliciteurs généraux alors que le second niveau correspond à une reconnaissance « spécifique » et fait intervenir des éliciteurs plus spécifiques ou effecteurs d'avirulence.

### **II. 2. 1. Interactions impliquant les PAMPs**

Le premier niveau de reconnaissance est basé sur la reconnaissance par la plante des PAMPs ou MAMPs (Pathogen or Microbe Associated Molecular Pattern) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires appelés PRRs (Pattern Recognition Receptor) et mène à la PTI (PAMP-Triggered Immunity) (Jones and Dangl 2006; Boller and Felix 2009). Les PAMPs sont des motifs très conservés présents sur des molécules d'origine microbienne. Ils sont souvent indispensables à la pathogénie et au développement du parasite (Nürnberg et al. 2004; Chisholm et al. 2006). Les PAMPs peuvent être trouvés sur des molécules de nature très différentes comme les lipopolysaccharides des parois bactériennes, les oligomères de chitine, de  $\beta$ -glucane et de chitosane constituant les parois des champignons ou la flagelline, protéine de structure majoritaire des flagelles bactériens.

D'autres éliciteurs généraux peuvent mener à la PTI, il s'agit des DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern). Les DAMPs sont des PAMPs d'origine endogène provenant de la plante elle-même. Ils sont souvent perçus par la plante suite à la pénétration d'un agent pathogène, qui en dégradant les parois cellulaires, relargue des composants pariétaux sur lesquels sont présent des DAMPs.

Il a été montré par exemple que les plantes peuvent reconnaître les oligo- $\alpha$ -galacturonides libérés suite à l'action d'enzymes fongiques sur les parois cellulaires et activer des mécanismes de défense (Denoux et al. 2008).

Chez les plantes, plusieurs récepteurs PRRs impliqués dans la reconnaissance de divers composés d'origine fongique ont été identifiés. Chez *Arabidopsis thaliana*, les récepteurs LRR-RLK (Leucine-Rich Repeat Receptor Like Kinase) CERK1 (Miya et al. 2007) et LysM RLK1 (Wan et al. 2008) sont capables de reconnaître les oligomères de chitine. Les PRRs peuvent aussi appartenir aux LRR-RLP (Leucine-Rich Repeat Receptor Like Protein). Le récepteur LeEix2 (*Lycopersicon esculentum* Ethylene-Inducing Xylanase), une protéine de type LRR-RLP (Leucine-Rich Repeat Receptor Like Protein), reconnaît un motif de la xylanase fongique EIX (Ron and Avni 2004). Un autre récepteur, CeBiP (Chitin elicitor Binding Protein), est impliqué dans la perception des fragments de  $\beta$ -glucane chez le soja, de xylanase chez la tomate et de chitine chez le riz (Umemoto et al. 1997; Kaku et al. 2006). C'est un récepteur protéique glycosylé présentant deux domaines LysM extracellulaires mais pas de domaine kinase intracellulaire (Kaku et al. 2006). Cette absence de domaine kinase intracellulaire suggère que d'autres partenaires sont requis pour la transduction du signal.

La reconnaissance des PAMPs ou DAMPs par les récepteurs membranaires PRRs induit une résistance basale (PTI) qui va entraver la progression de l'agent pathogène et donc limiter l'intensité des symptômes (Jones and Dangl 2006).

## **II. 2. 2. Interactions impliquant des effecteurs**

La résistance basale (PTI), première branche du système immunitaire des plantes, n'est cependant pas efficace vis-à-vis de tous les agents pathogènes. Au cours de l'évolution, les microorganismes se sont adaptés et ont acquis des effecteurs de virulence (facteurs de virulence) capables d'interférer avec les mécanismes de défense mis en jeu lors de la PTI. La plante devient alors sensible ; on parle de l'« Effector-Triggered Susceptibility » (ETS) (Jones and Dangl 2006). Cependant, les plantes ont également acquis des gènes codant pour des protéines dites de « résistance » capables de reconnaître certains effecteurs produits par les agents pathogènes et entraînant la mise en place d'un second niveau de défense menant à l'« Effector-Triggered Immunity » (ETI) (Jones and Dangl 2006). Les effecteurs sont définis comme étant des molécules produites par les agents pathogènes qui manipulent la structure et le fonctionnement cellulaire de l'hôte facilitant ainsi l'infection (facteurs de virulence ou toxines) et/ou entraînant des mécanismes de défense (facteurs d'avirulence et éliciteurs) (Kamoun 2007).

Chez les champignons biotrophes dont la survie dépend de l'intégrité des cellules de la plante, la mise en place de la HR (Hypersensitive Response), qui correspond à la mort programmée d'un nombre restreint de cellules au site d'infection, déclenchée à l'issue de la reconnaissance par la plante d'un effecteur du champignon, conduit à l'ETI en bloquant la propagation du champignon. A l'inverse, ce type de reconnaissance favoriserait le développement des champignons nécrotrophes qui se nourrissent des tissus en décomposition et conduit alors à l'ETS (Friesen et al. 2008a). Les effecteurs peuvent être de nature chimique variée. Chez les champignons biotrophes, les effecteurs sont le plus souvent des protéines appartenant à la classe des Small Secreted Protein (SSP).

Par contre, chez les nécrotrophes, de nombreux effecteurs de pathogénie se sont révélés être des métabolites secondaires.

## II. 2. 2. 1. L'Effector-Triggered Susceptibility (ETS)

Les effecteurs de pathogénie peuvent agir à différents niveaux de la mise en place des défenses de la plante. Ceci est particulièrement bien documenté chez les bactéries. Ainsi, *Pseudomonas syringae* est capable de produire une phytotoxine, la coronatine, induisant la réouverture des stomates qui s'étaient fermés suite à la détection par la plante du PAMP de la flagelline (Flg22) (Melotto et al. 2008). Les stomates ainsi réouverts, *P. syringae* peut pénétrer à l'intérieur de l'apoplasme et délivrer divers effecteurs directement à l'intérieur des cellules de l'hôte par l'intermédiaire du système de sécrétion de type 3 ou TTSS (Type Three Secretion System). Parmi ces effecteurs, AvrPto est capable de se lier avec les récepteurs PRRs FLS2 et EFR chez *Arabidopsis* inhibant leur autophosphorylation et empêchant donc la transduction du signal de défense (Xiang et al. 2008). D'autres effecteurs de *P. syringae*, HopAI-1 et AopA01, agissent au niveau des MAPKs (Mitogen Activated Phosphatase Kinase), inhibant ainsi la mise en place des défenses (Underwood et al. 2007; Zhang et al. 2007).

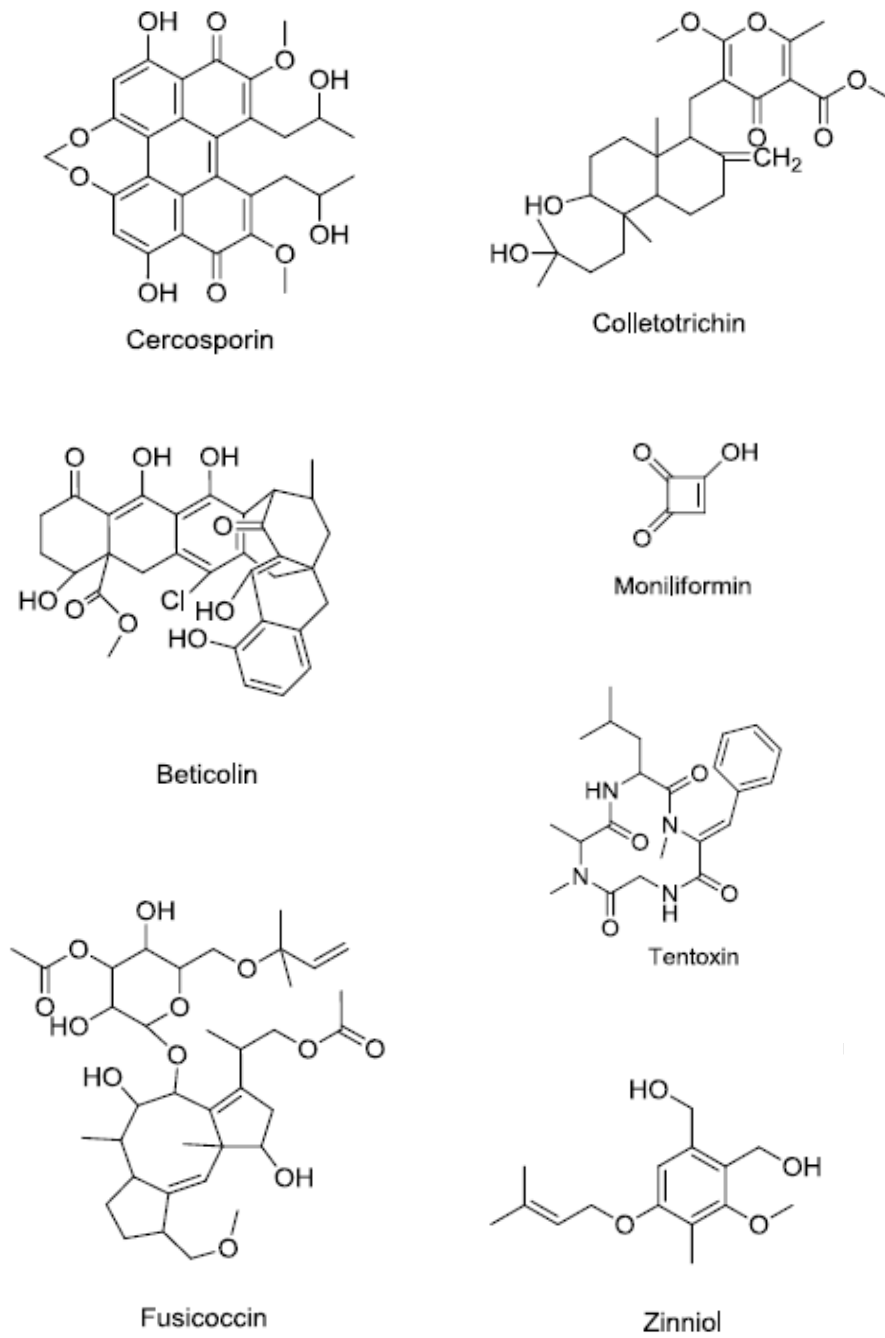
On trouve également de nombreux exemples d'effecteurs entraînant la sensibilité de l'hôte chez les champignons biotrophes et hémibiotrophes. Chez l'ascomycète *Cladosporium fulvum*, plusieurs effecteurs capables d'interférer dans la PTI ont été mis en évidence : Avr2, Avr4 et Ecp6. Avr2 inhibe de multiples protéases cystéine chez la tomate qui sont requises dans la défense basale (Van Esse et al. 2008). Avr4 contient un domaine fonctionnel de liaison à la chitine qui protège le champignon contre l'activité des chitinases de la plante (van den Burg et al. 2006; Van Esse et al. 2007). Enfin, Ecp6 présente un domaine LysM essentiel à la virulence du champignon permettant la séquestration des fragments de chitine relargués de la paroi des hyphes durant l'infection et empêchant ainsi leur reconnaissance par les récepteurs PRRs de la plante (de Jonge et al. 2010). Chez l'ascomycète *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, deux effecteurs de virulence sécrétés dans le xylème durant l'infection de la tomate ont été identifiés. Il s'agit d'Avr2 (Six3) et Avr3 (Six1). La délétion de ces gènes entraîne une forte diminution de l'agressivité de l'agent pathogène (Rep et al. 2004; Houterman et al. 2009). Leurs cibles sont encore inconnues.

Les champignons nécrotrophes colonisent les tissus de leur hôte par la sécrétion de divers effecteurs tels que de nombreuses enzymes de dégradation des parois (Amselem et al. 2011) ou des toxines (Walton 1996, 2006; Friesen et al. 2008a; Duke and Dayan 2011). Récemment, une xylanase (Xyn11A) se comportant comme un facteur de virulence a été décrite chez le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* ; elle induit des nécroses indépendamment de son activité enzymatique (Noda et al. 2010). La production de formes réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) est généralement associée à la mise en place de la HR qui est un mécanisme de défense très efficace vis-à-vis des agents pathogènes biotrophes. La présence de ROS est également détectée chez des plantes infectées par des agents pathogènes nécrotrophes comme *B. cinerea* et *Sclerotinia sclerotinium* et semble liée à la sensibilité de l'hôte contrairement aux biotrophes.

Il a été montré que l'inhibition de la production de ROS chez *B. cinerea* lors d'une infection a un effet négatif sur le développement de la maladie (Rolke et al. 2004).

L'analyse de souches de *B. cinerea* et *S. sclerotinium* mutées sur deux NADPH oxydases (*BcnoxA*, *BcnoxB*, *Ssnox1*, *Ssnox2*) montre que *BcnoxA* est impliqué dans l'extension des lésions alors *BcnoxB* est plutôt impliqué dans la pénétration, le double mutant pour ces deux gènes étant avirulent (Segmüller et al. 2008). Concernant *S. sclerotinium*, le pouvoir pathogène des mutants *Ssnox1* diminue tandis que les mutants *Ssnox2* conservent leur pouvoir pathogène (Amselem et al. 2011). Ces travaux montrent bien l'implication de ces agents pathogènes dans la génération de ROS durant l'infection et soulèvent l'existence d'un puissant système antioxydant leur permettant de résister à un tel environnement.

Les champignons nécrotrophes produisent également une grande diversité de toxines qui peuvent être de différentes natures (métabolites secondaires, protéines) (Friesen et al. 2008a; Duke and Dayan 2011). Les toxines peuvent être définies comme étant des molécules synthétisées par les agents pathogènes capables de reproduire en partie ou entièrement les symptômes engendrés par l'agent pathogène lui-même lorsqu'elles sont apportées aux plantes hôtes à des doses physiologiques (Oliver and Solomon 2010). Deux types de toxines peuvent être distingués : les toxines « non hôte-spécifiques » qui ont une très large gamme d'hôtes (avec un spectre d'hôtes plus étendu que celui de l'agent pathogène lui-même) et les toxines « hôte-spécifiques » ou HST (Host-Specific Toxins) dont la toxicité est observée seulement sur des génotypes particuliers de l'hôte et dont le spectre d'hôte est identique à celui du champignon (Oliver and Solomon 2010). Les toxines non HST sont des déterminants secondaires de la pathogénie alors que les toxines HST sont des déterminants primaires de la pathogénie.



**Figure 10 : Structure de quelques toxines non hôte-spécifiques d'origine fongique.**  
(Duke and Dayan 2011)

### Les toxines « non hôte-spécifiques »

La cercosporine (Fig. 10) est produite par de nombreuses espèces phytopathogènes de *Cercospora* et affecte de nombreuses espèces végétales (riz, banane, café, soja, tabac...). Sa biosynthèse est activée par la lumière et sa toxicité est dépendante de la lumière et de l'oxygène. Elle contient un chromophore perenylquinone lui permettant d'absorber et de transférer l'énergie lumineuse à l'oxygène générant ainsi des formes réactives de l'oxygène intermédiaires ( $^1\text{O}_2$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Il en résulte la peroxydation des lipides membranaires, des fuites d'électrolytes et éventuellement la mort cellulaire de l'hôte (Daub and Ehrenshaft 2000; Daub et al. 2005; Daub and Chung 2009).

Les béticolines (Fig. 10) sont des toxines produites par *Cercospora beticola* qui s'auto-assemblent pour former un pore peu sélectif dans la membrane de l'hôte entraînant un effondrement des gradients ioniques et électriques (influx de  $\text{Ca}^{2+}$ ) et brouillant les signaux cellulaires (Goudet et al. 2000).

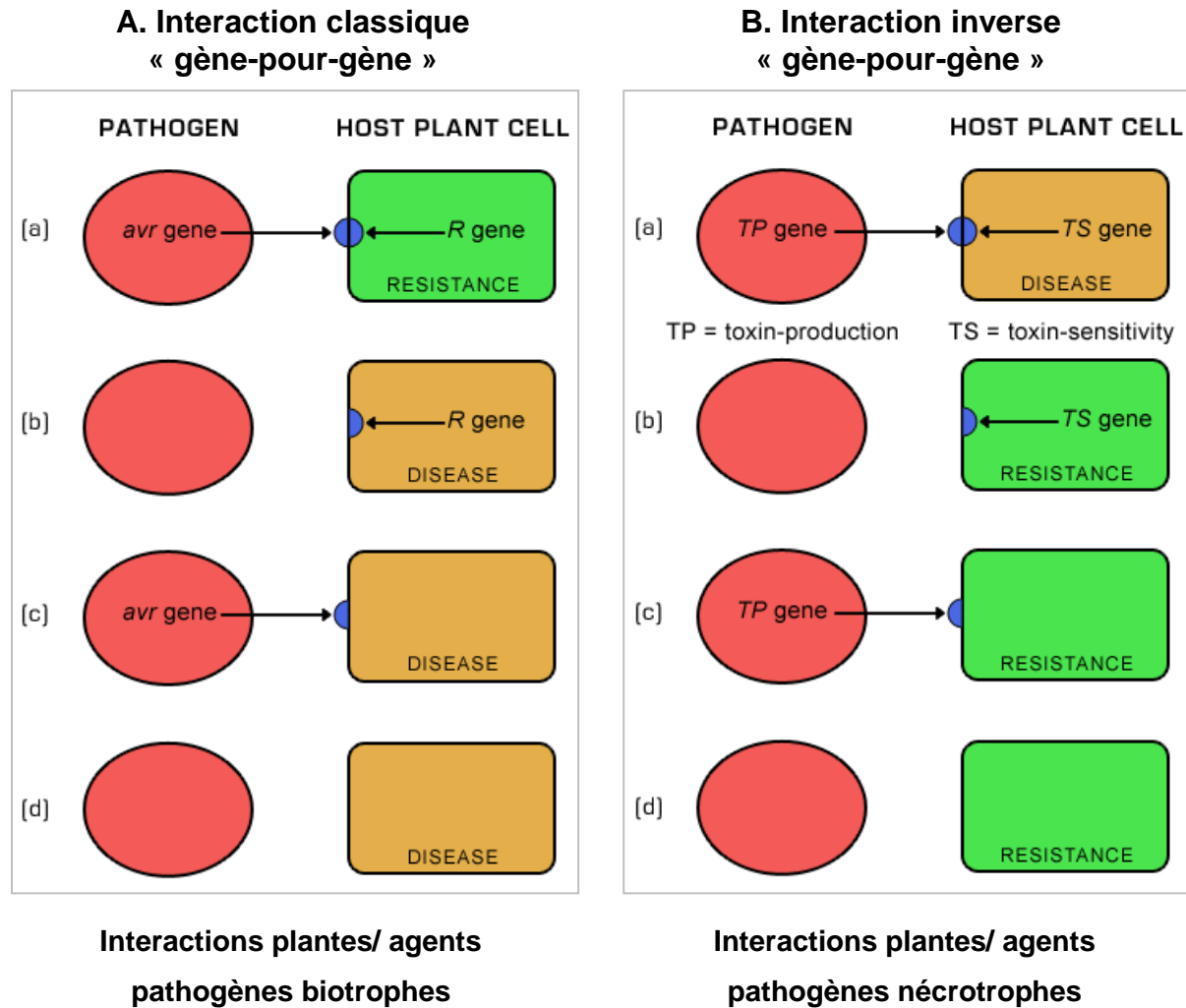
La fusicoccine (Fig. 10) est produite par *Fusicoccum amygdali*. Elle active de manière irréversible les  $\text{H}^+$ -ATPases de la membrane plasmique de l'hôte bloquant ainsi la fermeture des stomates et entraînant le flétrissement des tissus (Aducci et al. 1995).

La colletotrichine (Fig. 10) est produite par plusieurs espèces de *Colletotrichum*. Elle entraîne la désintégration des membranes plasmiques et est accompagnée de fuites massives d'électrolytes. Cette toxine n'agirait cependant pas de manière directe sur la membrane plasmique (Gohbara et al. 1978).

La moniliformine (Fig. 10) qui est produite par *Fusarium moniliforme* entraîne un arrêt de la mitose en métaphase dans les cellules méristématiques racinaires du maïs en perturbant l'organisation du fuseau mitotique (pas d'effet direct sur la tubuline) (Styer and Cutler 1984).

La tentoxine (Fig. 10) produite par *Alternaria alternata* inhibe le développement du chloroplaste entraînant une chlorose des tissus (Halloin et al. 1970). La tentoxine agit comme un inhibiteur des phosphorylations en se liant spécifiquement avec l'ATP synthase des chloroplastes entraînant alors l'inhibition de l'hydrolyse et de la synthèse d'ATP (Steele et al. 1978a; Steele et al. 1978b). D'autres toxines sont produites par différentes espèces d'*Alternaria* comme la Bréfeldine A qui entraîne un désassemblage du complexe golgien inhibant ainsi la sécrétion de protéines, la curvularine qui inhibe les divisions cellulaires en perturbant l'assemblage des microtubules, l'acide ténuazonique qui inhibe la synthèse de protéine ou encore le zinniol (Fig. 10) qui affecte la perméabilité membranaire (Meronuck et al. 1972; Robeson et al. 1985; Fujiwara et al. 1988; Thuleau et al. 1988).

Certaines toxines non HST peuvent également être de nature protéique (issues de la synthèse ribosomale). C'est le cas de trois petites protéines de *Rhynchosporium secalis* appelées Nip1, Nip2 et Nip3 qui pourraient agir au niveau des pompes à protons de la membrane plasmique des plantes (Wevelsiep et al. 1993).



**Figure 11 : Comparaison des interactions « gène-pour-gène » dans les pathosystèmes biotrophe et nécrotrophe.**

**A : Interaction classique «gène-pour-gène».** La résistance est induite seulement si la plante possède un gène de résistance qui va reconnaître spécifiquement le gène d'avirulence de l'agent pathogène (a). L'absence soit du gène d'avirulence de l'agent pathogène (b), soit du gène de résistance de la plante (c) ou des deux (d) entraîne la non reconnaissance de l'agent pathogène par la plante et la maladie.

**B : Interaction inverse « gène-pour-gène ».** La maladie se développe seulement si la plante possède un gène de sensibilité qui va reconnaître spécifiquement le gène de virulence de l'agent pathogène (toxine hôte-spécifique) (a). L'absence soit du gène de virulence de l'agent pathogène (b), soit du gène de sensibilité de la plante (c) ou des deux (d) entraîne l'absence de maladie.

[http://bugs.bio.usyd.edu.au/PlantPathology/infection/plant\\_defenses/resistanceGenetics.html](http://bugs.bio.usyd.edu.au/PlantPathology/infection/plant_defenses/resistanceGenetics.html)

(Angela Moncrief)

### Les toxines hôte-spécifiques

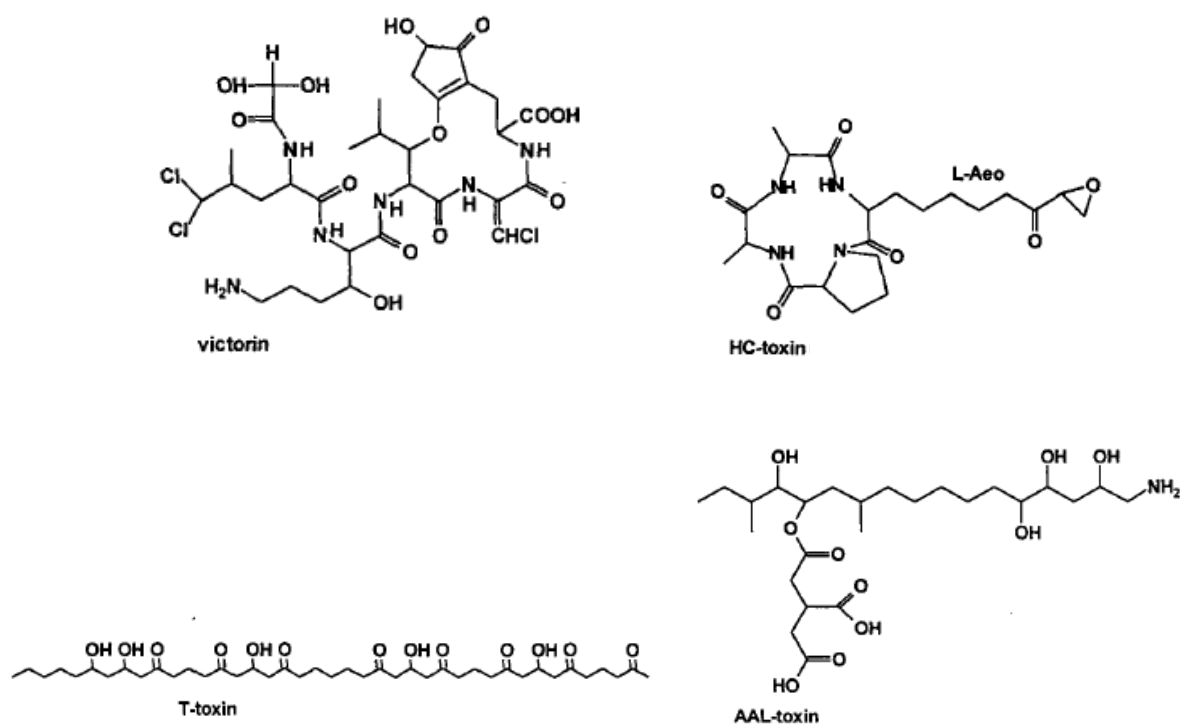
Des analyses génétiques des plantes hôtes de plusieurs champignons pathogènes nécrotrophes produisant des HSTs ont permis de mettre en évidence que, dans la majorité des cas, la sensibilité aux HSTs était un trait dominant. En d'autres termes, l'agent pathogène produit un effecteur qui entraîne la maladie uniquement chez les plantes hôtes produisant un récepteur connexe, requis pour la sensibilité. Ce processus, qui mène à l'ETS dans le cas des pathosystèmes nécrotrophes, a été présenté comme étant un miroir de l'interaction « gène-pour-gène » classiquement observée dans les pathosystèmes biotrophes dans lesquels l'interaction entre les produits d'un gène dominant de l'hôte (gène de résistance) et d'un gène de l'agent pathogène (gène d'avirulence) entraîne l'ETI (Fig. 11) (Wolpert et al. 2002; Friesen et al. 2007; Friesen et al. 2008a). Dans ces deux types de pathosystème (biotrophe et nécrotrophe), cette interaction effecteur/récepteur a la même finalité : elle entraîne la mort cellulaire de l'hôte. Dans le cas des agents biotrophes, elle conduit à la résistance de l'hôte alors que chez les agents nécrotrophes, cette réponse de la plante apparaît être un avantage du fait de leur mode trophique et conduit à la sensibilité de l'hôte. Ci-dessous, quelques exemples de HSTs de nature non protéique.

La victorine (Fig. 12) est une toxine produite par *Cochliobolus victoriae* qui entraîne la sensibilité des variétés d'*Avena sativa* (avoine) porteuses du gène *Vb*. Cette toxine, de nature non protéique, est capable d'interagir avec deux protéines du complexe glycine décarboxylase des mitochondries et d'inhiber la biosynthèse de sérine (Navarre and Wolpert 1995; Curtis and Wolpert 2004). La sensibilité de l'écotype CI-0 d'*A. thaliana* à *C. victoriae* a permis l'isolation du gène de sensibilité *LOV1* (Locus Orchestrating Victorin Effects1) (Lorang et al. 2004). L'application de victorine induit des réactions de défense seulement dans les génotypes d'*A. thaliana* porteur du gène *LOV1* (Lorang et al. 2007).

La HC-toxine (Fig. 12) produite par *Cochliobolus carbonum*, est un déterminant majeur de la pathogénie du champignon chez le maïs. Des souches déficientes pour la production de HC-toxine entraînent de toutes petites lésions sur plantes sensibles comparé aux souches de *C. carbonum* qui produisent la toxine. La HC-toxine agit comme un inhibiteur des histones désacétylases. Elle entraînerait une modification de l'expression des gènes de défense par hyperacétylation des histones (Walton 2006).

La T-toxine (Fig. 12) est produite par les souches de *Cochliobolus heterostrophus* de la race T. Ces isolats sont très agressifs sur les plants de maïs porteur du gène *tms* (texas male sterile). A l'inverse, les souches qui ont perdu la capacité à synthétiser la T-toxine présentent une très faible pathogénie sur toutes les variétés de maïs (Yang et al. 1996). Il a été montré que la T-toxine interagissait avec la protéine mitochondriale URF-13, présente seulement chez les variétés TMS de maïs sensibles. De cette interaction résulte la formation d'un pore dans la membrane de la mitochondrie entraînant la fuite des molécules, un effondrement du gradient électrochimique membranaire et de la production d'ATP (Rhoads et al. 1995; Siedow et al. 1995).





**Figure 12 : Structure de quelques toxines hôte-spécifiques.**

(Walton 1996)

L'AAL-toxine (Fig. 12) produite par *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* est un analogue de la sphingosine. Elle inhibe la sphingosine-N-acétyltransférase une enzyme centrale de la voie de biosynthèse des sphingolipides qui jouent un rôle important au niveau de l'intégrité des membranes (Abbas et al. 1994).

Plusieurs HSTs de nature protéique ont également été caractérisées chez deux agents pathogènes majeurs du blé *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr) et *Stagonosporum nodorum* (Sn). *P. tritici-repentis* peut produire quatre HSTs : PtrToxA qui induit des nécroses (Ballance et al. 1989; Tomas et al. 1990; Tuori et al. 1995), PtrToxB qui induit des chloroses (Ciuffetti et al. 1998; Strelkov et al. 1999; Martinez et al. 2001), PtrToxC (Effertz et al. 2002) et PtrToxD (Manning et al. 2002). Parmi ces quatre toxines, PtrToxA et PtrToxB sont des protéines, PtrToxC est un métabolite secondaire et PtrToxD n'est pas encore caractérisée. Sur la base des trois premières toxines (ToxA, B et C), huit races de l'agent pathogène ont pu être définies en fonction des toxines présentes (seules ou en combinaison) dans ces isolats, avec pour chacune un spectre d'hôtes particulier (Lamari et al. 2003). Il a été montré que la sensibilité des cultivars de blé à chacune de ces trois toxines était conférée par des gènes dominants différents, *Tsn1* pour la sensibilité à PtrToxA, *Tsc2* pour la sensibilité à PtrToxB et *Tsc1* pour la sensibilité à PtrToxC (Gamba et al. 1998; Anderson et al. 1999; Strelkov et al. 1999; Friesen and Faris 2004).

*PtrToxA* code une protéine contenant un peptide signal de sécrétion (Ballance et al. 1996; Ciuffetti et al. 1997), un domaine N-terminal de 4,3 KDa impliqué dans le repliement de la protéine et un domaine C-terminale de 13,2 KDa codant pour la protéine mature (Tuori et al. 1995; Tuori et al. 2000). Cette protéine serait internalisée par endocytose dans les cellules des génotypes de blé sensibles uniquement (Sarma et al. 2005; Manning et al. 2008). Des études en microscopie ont permis de montrer, qu'une fois internalisée, PtrToxA avait une localisation chloroplastique. La mort cellulaire induite par PtrToxA est dépendante de la lumière et associée à une accumulation de ROS dans les chloroplastes (Manning and Ciuffetti 2005; Manning et al. 2009). De plus, cette toxine est capable d'interagir directement avec la plastocyanine et une autre protéine du chloroplaste ToxABP1 (ToxA Binding Protein 1) (Manning et al. 2007; Tai and Bragg 2007). L'homologue de ToxABP1 chez *A. thaliana*, Thf1 (Thylakoid formation 1), est impliqué dans la biogénèse/dégradation du photosystème II (Keren et al. 2005). La perte de fonction de ce gène résulte en un stress oxydatif ainsi qu'une inhibition du développement chloroplastique présentant des similitudes avec les symptômes induits par PtrToxA. Cependant, le « silencing » de ToxABP1 n'entraînant pas une annulation complète des symptômes induits par PtrToxA, il semblerait que d'autres protéines de plantes soient la cible de la toxine et des études sont en cours afin de tester l'hypothèse de l'implication de la toxine dans l'altération des mécanismes de détoxification des ROS dans les chloroplastes (Manning et al. 2010). A l'heure actuelle, aucune interaction directe ou indirecte n'a pu être mise en évidence entre PtrToxA et le produit du gène de sensibilité *Tsn1*.

*PtrToxB* code une protéine sécrétée dont la masse moléculaire prédite est de 6,5 KDa (Martinez et al. 2001). Les modes d'action de PtrToxB sont beaucoup moins connus et apparaissent être beaucoup plus complexes que pour PtrToxA (Ciuffetti et al. 2010).

Contrairement à *PtrToxA*, *PtrToxB* est codée par plusieurs copies identiques du même gène en fonction des races de blé (de deux à dix copies). L'agressivité des isolats contenant *PtrToxB* a montré être corrélée au nombre de copies du gène. Deux homologues différents de *PtrToxB* en simple copie ont été trouvés dans deux races différentes de l'agent pathogène qui n'induisent pas la chlorose caractéristique entraînée par *PtrToxB* sur les cultivars de blé sensibles (Lamari et al. 2003; Martinez et al. 2004).

Le premier homologue de *PtrToxB* est très faiblement transcrit (Martinez et al. 2004; Amaike et al. 2008). La différence de séquence entre les deux protéines (81% d'identité) pourrait expliquer leur différence d'activité (Kim and Strelkov 2007). L'autre homologue de *PtrToxB* présent dans la race 3, possède 18 acides aminés supplémentaires ainsi que deux mutations dans son peptide signal. Cependant, la partie mature de la protéine est 100% identique à celle de *PtrToxB*. La transcription du gène n'est pas affectée et la perte d'activité de la protéine serait probablement liée à l'altération de son peptide signal résultant en une altération de sa structure (Strelkov et al. 2006).

Ses modes d'action en tant que toxine sont peu connus, néanmoins il a été montré que la chlorose engendrée, corrélée à une diminution de la chlorophylle a et b, était dépendante de la lumière et pourrait influencer dans la production de ROS (Strelkov et al. 1998). *PtrToxB* pourrait également avoir un rôle lors des phases précoces de l'infection. En effet, une accumulation très précoce de transcrits a été détectée dans le mycélium et les conidies de l'agent pathogène lors de l'infection sur l'ensemble des génotypes de blé sensibles et résistants. De plus, cette forte accumulation de transcrits était corrélée à un développement rapide de l'appressorium (Amaike et al. 2008).

Des homologues de *PtrToxB* ont été identifiés par Southern blot dans d'autres champignons appartenant aux genres *Cochliobolus*, *Alternaria* et *Pyrenophora* (Andrie et al. 2008). Une étude récente a montré que des homologues de *PtrToxB*, présents dans *Pyrenophora bromi* (Pb), pathogène de l'herbacée *Bromus inermis*, étaient exprimés (Andrie and Ciuffetti 2011). L'expression de ces gènes en système hétérologue a permis de tester la toxicité des protéines résultantes sur le brome et sur les génotypes de blé sensibles à *PtrToxB*. Ainsi, il a été montré que les protéines PbToxB n'avaient aucun effet sur le brome alors qu'elles étaient toxiques sur les génotypes de blé sensibles à *PtrToxB* et aux mêmes concentrations (Andrie and Ciuffetti 2011). De plus, ces gènes codant pour ces homologues étaient exprimés très faiblement par *P. bromi* inoculé sur blé. Ces données mettent en évidence le potentiel de ces isolats en tant qu'agents pathogènes potentiels du blé. Un gain de copie(s) et/ou une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ces gènes pourraient faire de *P. bromi* un nouvel agent pathogène pour le blé (Andrie and Ciuffetti 2011).

Un gène homologue de *PtrToxA* (*SnToxA*, 99,7% d'identité) a été identifié dans un autre agent pathogène du blé *S. nodorum* (Friesen et al. 2006). Il a été montré que *Tsn1* qui confère la sensibilité du blé à *PtrToxA* conférait également la sensibilité à *SnToxA* (Friesen et al. 2006; Liu et al. 2006). Compte tenu du polymorphisme plus important observé dans *S. nodorum* (13 haplotypes) comparé à *P. tritici-repentis* (3 haplotypes), il a été suggéré que *SnToxA* aurait été acquis par *P. tritici-repentis* par transfert horizontal (Friesen et al. 2006; Ciuffetti et al. 2010).

*S. nodurum* produit quatre autres HSTs protéiques appelées SnTox1, SnTox2, SnTox3 et SnTox4, associées à quatre gènes de sensibilité dominants dans les génotypes de blé sensibles nommés *Snn1*, *Snn2*, *Snn3* et *Snn4* (Liu et al. 2004a; Liu et al. 2004b; Friesen et al. 2007; Friesen et al. 2008b; Liu et al. 2009; Abeysekara et al. 2009).

Il a été montré que les interactions compatibles *Tsn1*-SnToxA et *Snn2*-SnTox2 avaient un effet additif et que, contrairement au modèle classique « gène-pour-gène » qui est qualitatif, la production de deux HSTs par une seule souche en présence des produits de deux gènes de sensibilité dans l'hôte entraînait des symptômes plus importants qu'une interaction seule (Friesen et al. 2008a; Friesen et al. 2008b). Il en est de même pour les interactions compatibles *Tsn1*-SnToxA et *Snn1*-SnTox1 (Chu et al. 2010). Le mode d'action de ces toxines n'est pas encore connu. Cependant, il a été montré que, comme pour PtrToxA ou SnToxA, l'activité de SnTox2 et SnTox4 était dépendante de la lumière (Friesen et al. 2007; Abeysekara et al. 2009).

Les facteurs de virulence qui mènent à l'ETS chez certaines plantes peuvent également conduire à l'activation d'une seconde branche du système immunitaire des plantes conduisant à l'ETI.

#### **II. 2. 2. 2. L'Effector-Triggered Immunity (ETI)**

Chez les champignons pathogènes biotrophes, la mise en place de l'ETI repose sur le concept gène-pour-gène (Flor 1955) et implique une reconnaissance spécifique entre un effecteur protéique de l'agent pathogène, appelé effecteur d'avirulence, et une protéine de résistance de la plante. Si cette reconnaissance s'opère, il y a activation d'une cascade de signalisation aboutissant à la mise en place des mécanismes de défense dont la HR qui est spécifiquement induite lors de l'ETI (réaction incompatible). En l'absence de la protéine d'avirulence de l'agent pathogène et/ou de la protéine de résistance correspondante dans l'hôte, la maladie se développe (réaction compatible).

Les effecteurs entraînant la mise en place de l'ETI sont appelés facteurs d'avirulence. Certains sont reconnus ou exercent leur fonction d'avirulence dans l'apoplasme des cellules infectées alors que d'autres exercent leur fonction dans le cytoplasme des cellules infectées. Des effecteurs des champignons extracellulaires ont été identifiés dans l'apoplasme des cellules infectées et interagissent avec leurs cibles dans ce même compartiment. C'est le cas des effecteurs Avr2, Avr4, Avr4E et Avr9 de *C. fulvum* qui interagissent avec les protéines de résistance Cf de la tomate qui possèdent un domaine extracellulaire (Laugé et al. 2000; Thomma et al. 2005).

Chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, trois effecteurs ont été identifiés dans le xylème de tomates infectées, Avr1, Avr2 et Avr3 reconnues par les protéines de résistance I (pour immunity) I-1, I-2 et I-3. Il a été suggéré que ces effecteurs interagissaient de manière extracellulaire avec les protéines de résistance. Cependant, bien qu'elle soit sécrétée dans le xylème, la protéine Avr2 est reconnue de manière intracellulaire par la protéine de résistance I-2 (Houterman et al. 2009).

Chez *Magnaporthe oryzae*, l'effecteur d'avirulence AvrPiz-t est reconnu dans le cytosol de la plante par la protéine de résistance Pi-t (Li et al. 2009). Un autre effecteur, AvrPita1, interagit également de manière intracellulaire avec la protéine de résistance Pita (Jia et al. 2000; Khang et al. 2010).

Chez *Melampsora lini*, agent pathogène de *Linum usitatissimum*, les effecteurs AvrL567 et AvrM exprimés dans l'haustorium, sont transloqués à l'intérieur de la cellule de l'hôte potentiellement par l'intermédiaire de signaux localisés dans les régions N-terminales des protéines (Rafiqi et al. 2010). Ces effecteurs AvrL567 et AvrM interagissent dans le cytoplasme des cellules de l'hôte avec les protéines de résistance L et M du Lin (Dodds et al. 2004; Dodds et al. 2006; Catanzariti et al. 2009).

Chez les oomycètes phytopathogènes, plusieurs effecteurs d'avirulence transloqués dans le cytoplasme de l'hôte ont été identifiés. Avr1b-1 de *Phytophthora sojae* est reconnu par la protéine Rps1 du Soja, Avr3a de *Phytophthora infestans* est reconnu par la protéine R3a de la pomme de terre, et ATR13 et ATR1 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* sont reconnus respectivement par les protéines RPP13 et RPP1 d'*Arabidopsis* (Allen et al. 2004; Shan et al. 2004; Armstrong et al. 2005; Rehmany et al. 2005). Ces effecteurs présentent une organisation commune de leur domaine N-terminal composé d'un peptide signal de sécrétion suivi d'une région composée d'un motif en acides aminés RxLR (Arginine, un acide aminé x, Leucine, Arginine) dEER (Aspartate, Glutamine, Glutamine, Arginine) (Win et al. 2007).

A noter que de nombreux effecteurs d'avirulence ont une fonction de virulence chez les plantes ne possédant pas la protéine de résistance correspondante. Comme nous l'avons vu précédemment, les effecteurs d'avirulence Avr2 et Avr4 de *C. fulvum* ont une fonction de virulence chez les tomates ne possédant pas les gènes de résistance associés Cf-2 et Cf-4 (Van Esse et al. 2007; Van Esse et al. 2008). Chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la protéine Avr2 a également une fonction de virulence chez les cultivars de tomates ne portant pas le gène de résistance I-2 (Houterman et al. 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment l'interaction effecteur/ récepteur qui mène à l'ETI chez les agents pathogènes biotrophes entraîne la sensibilité de la plante face aux nécrotrophes. On pourrait donc penser que l'ETI concerne exclusivement les agents biotrophes. Cependant, deux gènes de résistance à des effecteurs de virulence nécrotrophes ont été caractérisés. Contrairement aux protéines de résistance qui, en reconnaissant les effecteurs biotrophes entraînent les mécanismes de défense, ces protéines de résistance contrent directement les effets néfastes qu'induisent les effecteurs nécrotrophes soit en interagissant directement avec l'effecteur (Hm1) soit en rétablissant certains dysfonctionnements (Asc1).

Le gène *Hm1* code pour une HC-toxine réductase qui confère la résistance aux génotypes de maïs sensibles à la HC-toxine (HST) produite par la race 1 de *C. carbonum*. Cette HC-toxine réductase interagit avec la HC-toxine résultant en l'inactivation de la toxine (Johal and Briggs 1992; Meeley and Walton 1991).

Le gène *Asc1* (Alternaria Stem Cancer 1) entraîne la résistance à l'AAL toxine produite par *A. alternata* f.sp. *lycopersici* (Brandwagt et al. 2000). *Asc1* est un homologue du gène de levure *Lag1* dont le produit, impliqué dans la biosynthèse des sphingolipides, prévient la mort cellulaire induite par la toxine (Brandwagt et al. 2002).

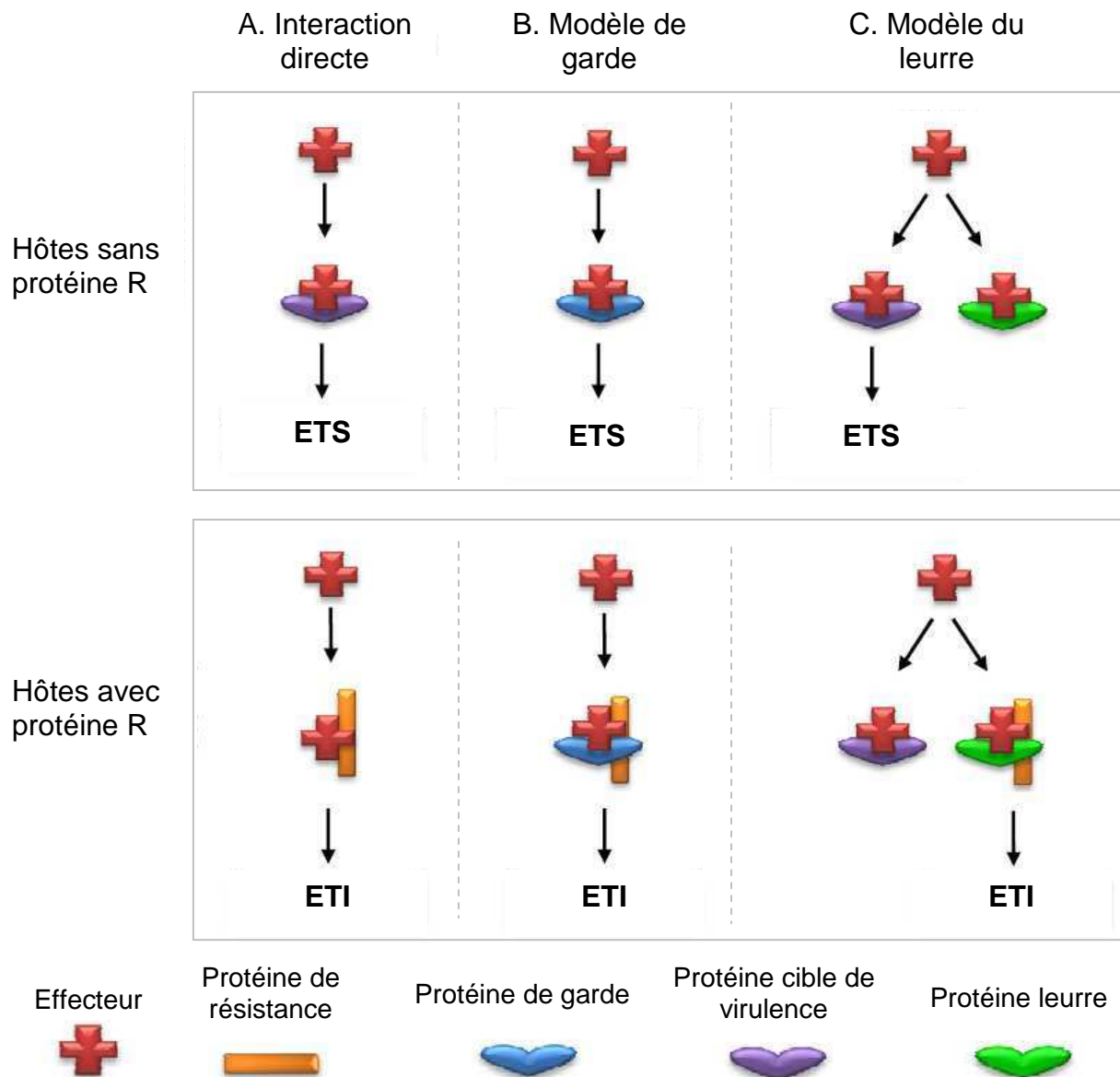
## **II. 2. 3. L'évitement ou la suppression de l'ETI**

La co-évolution entre les effecteurs de virulence des agents pathogènes et leurs récepteurs associés chez l'hôte a entraîné d'une part, la mutation ou l'acquisition de nouveaux effecteurs de virulence (mutation, duplication de gènes, transfert horizontal) chez les agents pathogènes biotrophes capables d'éviter ou de supprimer l'ETI et a contribué d'autre part à l'évolution des récepteurs (protéines de résistance) de l'hôte capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs (Dangl and Jones 2001).

Chez *Melampsora lini*, la sélection diversifiante résulte en douze variants alléliques du gène *AvrL567* répartis dans six souches. Parmi ces variants, cinq sont capables d'éviter la reconnaissance par les protéines de résistances L5, L6 et L7 chez le lin (Dodds et al. 2006). Des expériences de double hybride ont montré que les mutations accumulées dans les différents allèles d'*AvrL567* modifient les interactions protéine-protéine entre l'effecteur et la protéine de résistance suggérant ainsi que les pressions sélectives dues aux gènes de résistance sont associées à la spécificité de reconnaissance entre protéines (Ma and Guttman 2008).

Chez *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Avr1* (*Six4*) confère l'avirulence sur des lignées de tomates portant le gène de résistance *I-1*. Cependant, *Avr1* n'est pas requis pour la virulence sur des tomates ne portant pas *I-1*. Ces données suggèrent qu'*Avr1* aurait évolué comme un supprimeur de l'ETI. En effet, il a été montré que des souches de *F. oxysporum* initialement avirulentes sur des tomates portant les gènes de résistance *I-2* et *I-3* devenaient virulentes lorsqu'elles étaient transformées avec *Avr1*. *Avr1* a donc un rôle de supprimeur des réactions de défense médiées par les gènes de résistance *I-2* et *I-3* (Houterman et al. 2009).

La plupart des gènes codant pour des effecteurs de virulence chez les agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes sont localisés dans les régions dynamiques des génomes (régions télomériques ou riches en éléments transposables) ce qui leur permet d'évoluer rapidement expliquant ainsi le fait que ces effecteurs sont très diversifiés et qu'ils ne présentent souvent aucune homologie entre eux (Hogenhout et al. 2009).



**Figure 13 : Modèles d'interaction entre protéines de résistance et effecteurs.**

(Van der Hoorn and Kamoun 2008)

**A :** En l'absence de la protéine de résistance (R), l'effecteur se lie à sa protéine cible et entraîne l'ETS. En présence de la protéine R, l'ETI est activée.

**B :** En l'absence de la protéine R, une protéine de garde se lie à l'effecteur qui entraîne l'ETS. En présence de la protéine R, les modifications de la protéine de garde, suite à son interaction avec l'effecteur, sont détectées par la protéine R qui entraîne l'ETI.

**C :** En l'absence de la protéine R, l'effecteur peut soit se lier avec sa cible et entraîner l'ETS, soit se lier avec une protéine leurre et n'avoir aucun effet. En présence de la protéine R, l'interaction de l'effecteur avec sa cible n'aura aucun effet alors que l'interaction de l'effecteur avec la protéine leurre entraîne l'ETI.

## II. 2. 4. Les modèles d'interaction effecteur/ récepteur

Ces modèles sont basés exclusivement sur les connaissances acquises dans les pathosystèmes impliquant des agents pathogènes biotrophes (Fig. 13).

**Modèle « récepteur-ligand »** (Fig. 13A): Ce modèle correspond à l'interaction « gène-pour-gène » décrite par Flor entre le produit d'un gène de résistance et le produit d'un gène d'avirulence (Flor 1955). Plusieurs exemples peuvent être cités :

- Avr-Pita de *Magnaporthe grisea* avec Pi-ta de *Oryza sativa* (Jia et al. 2000)
- PopP2 de *Rhizoctonia solanacearum* avec RRS1-R d'*Arabidopsis* (Deslandes et al. 2003)
- AvrL567 de *Melampsora lini* et L de *Linum usitatissimum* (Dodds et al. 2004).

**Modèle de garde** (Fig. 13B): Ce modèle prédit que les protéines de résistance agiraient comme des gardiennes de la cible des effecteurs de virulence des agents pathogènes et que la modification de la cible par l'effecteur résulterait en l'activation de la protéine de résistance entraînant alors la résistance de l'hôte (Dangl and Jones 2001).

Les effecteurs AvrRpm1 et AvrB de *Pseudomonas syringae* sont responsables de la virulence de plusieurs souches sur *Arabidopsis* et le soja respectivement. Ces effecteurs ciblent RIN4, une protéine associée à la membrane plasmique, et induisent sa phosphorylation (Mackey et al. 2002). La modification de RIN4 active alors la protéine de résistance RPM1 (Resistance to *P. Syringae* pv Maculicola 1) qui induit la résistance de l'hôte. La cystéine protéase AvrRpt2 est un autre effecteur de *P. syringae* qui clive RIN4 activant alors la protéine de résistance RPS2 (Resistance to *P. Syringae* 2) et les défenses (Axtell and Staskawicz 2003; Chisholm et al. 2005; Kim et al. 2005). L'activation de RPM1 et RPS2 requiert une protéine glycophosphatidyl-inositol appelée NDR1 qui interagit avec RIN4 (Day et al. 2006).

L'effecteur de virulence Avr2 de *C. fulvum* inhibe RCR3 qui est une PR-protéine qui s'accumule dans l'apoplasme en réponse à une infection. Lorsque l'hôte possède la protéine de résistance Cf-2, Avr2 interagit avec RCR3 pour activer Cf-2 et déclencher l'induction des mécanismes de défense (Rooney et al. 2005).

**Modèle du leurre** (Fig. 13C): Ce modèle a récemment été suggéré par Van der Hoorn et Kamoun (2008) pour expliquer le fait que dans certain cas, les cibles des effecteurs ne sont pas indispensables à la virulence de l'agent pathogène chez les plantes dépourvues de la protéine de résistance correspondante. Ainsi, il a été suggéré que les protéines RIN4 et RCR3 pourraient être des leures empêchant l'interaction des effecteurs avec leur vrai cible (Van der Hoorn and Kamoun 2008).

Au cours de l'infection de la tomate par *C. fulvum*, une autre protéase à cystéine nommée PIP1 est induite et accumulée beaucoup plus fortement qu' RCR3 dans l'apoplasme. Les plantes mutées *rcr3* montrent une sensibilité équivalente à des plantes sauvages dépourvues du gène de résistance Cf-2 alors que PIP1 semble indispensable à la virulence de l'agent pathogène. De plus, PIP1 est capable d'interagir avec Avr2 (Shabab et al. 2008).



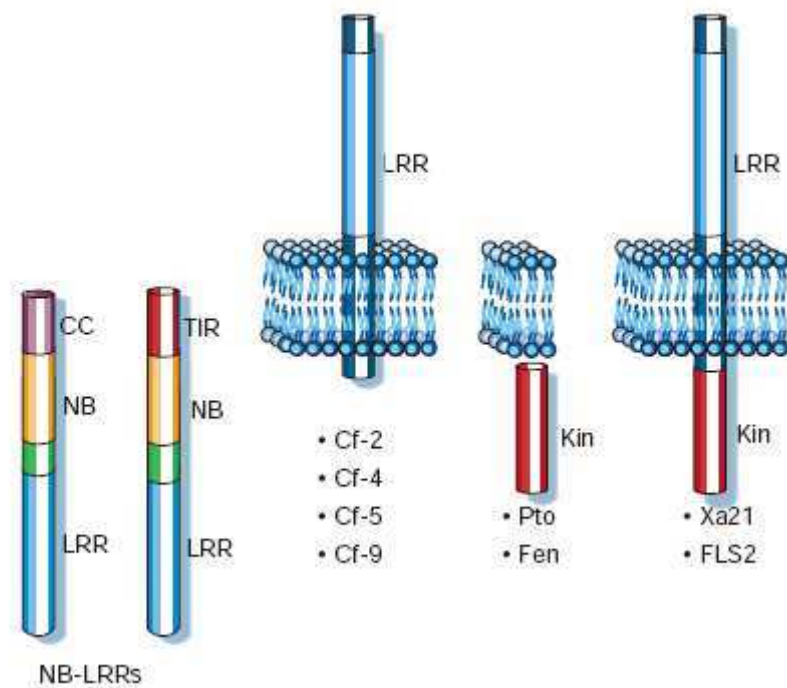
Ainsi, PIP1 serait la véritable cible d'Avr2, RCR3 serait donc un leurre. Cependant, des travaux plus récents ont démontré que des plantes mutées *rcr3* étaient beaucoup plus sensibles à *P. infestans* comparées à des sauvages démontrant ainsi qu'RCR3 joue un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes et qu'il n'est probablement pas juste un leurre (Song et al. 2009). Concernant RIN4, les mécanismes de défense sont supprimés chez les plantes surexprimant *RIN4* et légèrement augmentés dans les plantes mutées *rin4* (Kim et al. 2005). Ainsi, RIN4 peut donc être considéré comme un leurre jusqu'à preuve du contraire. Il serait une imitation de structure mais pas de fonction qui ciblerait les effecteurs de virulence ainsi que les composants du signal de la PTI (Hou et al. 2011).

## **II. 2. 5. Translocation des effecteurs dans la cellule hôte**

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux effecteurs des champignons et oomycètes interagissent avec des protéines intracellulaires de l'hôte. Chez les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, ces effecteurs sont à priori sécrétés au niveau de certaines structures d'infection tel que l'haustorium ou des structures apparentées (Khang et al. 2010; Rafiqi et al. 2010).

Chez les oomycètes, la translocation des effecteurs dans la cellule hôte se ferait par l'intermédiaire de motifs très conservés RxLR (Arginine, un acide aminé x, Leucine, arginine) et parfois dEER (Aspartate, Glutamine, Glutamine, Arginine). En effet, une analyse fonctionnelle d'Avr3a de *P. infestans* a démontré qu'il s'accumulait dans l'haustorium et que sa translocation dans la cellule de l'hôte nécessitait la présence des motifs RxLR et dEER (Whisson et al. 2007). Ces motifs sont également requis pour la translocation d'Avr1b dans le cytoplasme de l'hôte (Dou et al. 2008a). D'autres motifs présents sur les effecteurs CRN (Crinkler effector) ont pu être identifiés chez les oomycètes : LxLFLAK et HVLVxxP de *Phytophthora spp.* (Win et al. 2007; Haas et al. 2009). On trouve également des motifs similaires F/LxLYLALK et LxLYLAR/K chez *Aphanomyces euteiches* (Gaulin et al. 2008). Ces motifs apparaissent aussi être essentiels à la translocation des effecteurs CRN dans la cellule hôte (Schornack et al. 2010).

Chez le champignon nécrotrophe *P. tritici-repentis*, un motif RGD présent sur la HST PtrToxA est impliqué dans la translocation de la toxine à l'intérieur des cellules de l'hôte. Le cotraitement de feuilles de cultivars de blé sensibles avec PtrToxA et des peptides contenant le motif RGD réduit l'internalisation de PtrToxA et diminue les symptômes (Manning et al. 2008). De plus, la mutation du motif RGD de PtrToxA annule l'internalisation de la toxine ainsi que sa toxicité. Ces résultats montrent bien l'importance de ce motif dans la liaison à un récepteur ainsi que dans son internalisation par endocytose dans les cellules de blé sensibles. D'autres motifs moins conservés et plus difficilement reconnaissables que les RxLR-dEER ont pu être identifiés chez les champignons. Parmi eux, le motif RYWT présent dans AvrLm6 de *L. maculans*, les motifs RFYR et KFLK identifiés respectivement dans AvrL567 et AvrM de *M. lini* et la région RIYER identifiée dans Avr2 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Kale et al. 2010; Rafiqi et al. 2010).



**Figure 14 : Structure des principales classes de protéines de résistance.**  
(Dangl and Jones 2001)

Le(s) mécanisme(s) de translocation permettant aux effecteurs de pénétrer dans la cellule de l'hôte sont encore très peu connus. Une étude récente a montré que les motifs RxLR de *P. infestans* ainsi que d'autres motifs identifiés chez les champignons permettent la fixation des effecteurs à des phospholipides abondants au niveau de la surface externe de la membrane plasmique des cellules végétales. Un mécanisme d'entrée par endocytose a ainsi été suggéré (Kale et al. 2010).

## **II. 2. 6. Structures des protéines de résistance et de sensibilité**

### **Les protéines de résistance**

La comparaison de structure des protéines de résistance révèle la présence de domaines très conservés ayant un rôle dans les mécanismes de reconnaissance et de transduction des signaux (Fig. 14) (Dangl and Jones 2001).

De part leur structure, les protéines de résistance peuvent être regroupées, pour la majorité d'entre elles, en deux grandes classes. Ces deux classes regroupent des protéines intracellulaires NB-LRRs qui présentent un domaine central NB (Nucleotide Binding) et un domaine C-terminal riche en leucines répétées LRR (Leucin-Rich Repeat) (Fig. 14). Ces deux catégories de NB-LRR se distinguent par la nature de leur domaine en N-terminal. La première classe (TNL), constituée par les TIR-NB-LRRs, regroupe les protéines présentant domaine TIR (Toll Interleukine-Receptor) en N-terminal. Parmi les TIR-NB-LRRs, nous pouvons trouver les protéines L et M du lin conférant la résistance à *M. lini* (Dodds et al. 2009), les protéines Bs4 de la tomate, Gro1-4 de la pomme de terre et N du tabac qui confèrent la résistance à *Xanthomonas campestris*, *Globodera rostochiensis* et le virus de la mosaïque du tabac (TMV) respectivement (Bonas et al. 1993; Whitham et al. 1994; Erickson et al. 1999; Paal et al. 2004; Schornack et al. 2004). La seconde classe (CLN), constituée par les CC-NB-LRRs, regroupe les protéines présentant un domaine CC (Coiled-Coil) en N-terminal. Parmi les CC-NB-LRRs, nous pouvons citer les protéines RPM1 et RPS2 d'*Arabidopsis thaliana* conférant la résistance à *P. syringae* et à *M. grisea* (Mindrinos et al. 1994; Grant et al. 1995; Bryan et al. 2000). Ces deux classes sont les plus représentées actuellement chez les plantes. Les domaines LRRs interviennent dans la reconnaissance des protéines d'avirulence. En effet, il a été montré que le domaine LRR de la protéine Pita du Riz pouvait interagir seul avec AvrPi-ta de *M. oryzae* (Jia et al. 2000). Cependant, il est apparu que le domaine TIR de la protéine de résistance N du tabac était suffisant pour l'interaction avec l'effecteur p50 du TMV (Burch-Smith et al. 2006). Les domaines CC jouent aussi un rôle dans l'interaction des protéines de résistance RPM1 et RPS5 d'*Arabidopsis* avec leurs complexes protéiques cibles (Mackey et al. 2002; Ade et al. 2007).

Une troisième classe regroupe des protéines ancrées dans la membrane qui présentent un domaine LRR extracellulaire (Fig. 4). C'est le cas des protéines Cf-2, Cf-4 et Cf-9 de la tomate conférant la résistance à *C. fulvum* (Laugé et al. 2000; Thomma et al. 2005).

D'autres protéines de résistance de structures variées ont également été caractérisées. Parmi elles, deux présentent un domaine conservé. La protéine Pto de la tomate, conférant la résistance à *P. syringae*, présente un domaine Sérine Thréonine kinase intracellulaire et est la seule protéine de résistance de ce type caractérisée actuellement (Fig. 14) (Ronald et al. 1992; Martin et al. 1993).

La protéine Xa21 du riz conférant la résistance à *Xanthomonas oryzae* est ancrée dans la membrane et présente un domaine LRR extracellulaire ainsi qu'un domaine kinase intracellulaire et est également la seule protéine de résistance de ce type caractérisée actuellement (Fig. 14) (Wang et al. 1996; Song et al. 1997).

L'analyse des génomes a permis d'identifier de potentiels nouveaux gènes de résistance. Par exemple, le génome du peuplier contient quelques gènes atypiques de la famille des TNL comme des TIR-NB-LRR-TIRs ou TIR-NB-LRR-NBs et d'autres de la famille des CNLs ou un mix des deux familles TCNLs (Kohler et al. 2008). De tels gènes ont aussi observés chez *Arabidopsis* (Meyers et al. 2003). Une troisième classe de NB-LRR (BNL) constituée par les BED-finger-NB-LRRs qui présentent un domaine de type doigt de zinc en N-terminal a également été identifiée (Kohler et al. 2008). Cette dernière classe a été récemment trouvée dans le génome du peuplier (32 membres). Chez les plantes dicotylédones, ce type de structure en doigt de zinc n'a pu être trouvé que chez *Vitis vinifera* dans un NB-LRR de type TIR-NB-LRR-BED-TIR (Germain and Séguin 2011).

### **Les protéines de sensibilité**

Trois gènes de sensibilité ont été caractérisés à ce jour. Parmi eux, deux gènes conférant la sensibilité de l'hôte à deux HSTs de nature non protéique. Il s'agit du gène *LOV1* d'*A. thaliana* qui confère la sensibilité à la victorine, toxine produite par *C. victoriae*, et du gène *Pc* du sorgho qui confère la sensibilité à la Pc-toxine produite par *Periconia circinata*. Ces deux gènes codent pour des protéines appartenant à la classe des NB-LRRs (Lorang et al. 2007; Nagy and Bennetzen 2008). Très récemment un nouveau gène de sensibilité a été caractérisé, il s'agit du gène *Tsn1* qui confère la sensibilité des génotypes de blé face aux HSTs protéiques PtrToxA et SnToxA produites respectivement par *P. tritici-repentis* et *S. nodorum*. Ce gène code pour une protéine contenant un domaine sérine thréonine kinase et les domaines NB-LRR. (Faris et al. 2010). Des expériences de double hybride ont permis de montrer d'une part que Tsn1 n'interagissait pas directement avec PtrToxA et d'autre part qu'elle n'interagissait pas non plus directement avec la plastocyanine et ToxABP1 qui ont montré être des cibles directes de PtrToxA. Tsn1 ne fonctionnerait donc pas comme un gardien de ces deux cibles directes de PtrToxA (modèle de garde émis pour expliquer les interactions indirectes entre certains effecteurs biotrophes et leur protéine de résistance associée) (Faris et al. 2010).

Les homologies de structure entre les protéines de résistance et de sensibilité sont une preuve de l'évolution parallèle entre les gènes d'avirulence et les toxines hôte-spécifiques. La présence de gènes dominants de sensibilité aux toxines dans les plantes n'est pas plus paradoxale que la présence de gènes dominants d'avirulence dans les agents pathogènes et il est maintenant bien admis que de nombreux récepteurs des effecteurs nécrotrophes fonctionnent comme des gènes dominants de sensibilité aux maladies. Il est probable que la fonction initiale de ces gènes était de détecter d'autres agents pathogènes.

Un exemple parlant concerne deux maladies de l'avoine causées respectivement par le champignon biotrophe *Puccinia coronata*, agent de la rouille couronnée, et par le champignon nécrotrophe *Cochliobolus victoriae*. Initialement, il avait été montré que les isolats de *C. victoriae* produisant la victorine (HST) étaient pathogènes sur les génotypes d'avoine possédant le gène *Pc-2* conférant la résistance au champignon biotrophe *P. coronata*. Concernant la sensibilité à la victorine et à *C. victoriae*, un allèle dominant au locus *Vb* avait été identifié comme étant responsable de la sensibilité (Wolpert et al. 2002). Les génotypes d'avoine résistants à la rouille couronnée avaient été massivement plantés aux Etats Unis. Cependant, comme ils étaient sensibles à *C. victoriae*, il s'en est suivi des épidémies dévastatrices associées à des pertes de rendement allant jusqu'à 50% en 1945 et 1947 (Horbach et al. 2011). Toutes les approches tentées pour séparer les caractères de résistance à la rouille et de sensibilité à *C. victoriae* ont échouées. Les gènes *Pc-2* et *Vb* apparaissent très étroitement liés et pourraient être le même gène (Wolpert et al. 2002).

## *OBJECTIFS*



La maladie « *Corynespora Leaf Fall* » (CLF), bien qu'apparue récemment sur l'hévéa, est rapidement devenue un problème majeur pour l'hévéaculture des pays asiatiques et africains qui sont les principaux producteurs de latex. Compte-tenu de l'efficacité limitée des traitements antifongiques par rapport à leur coût, tant économique qu'écologique, la seule méthode de lutte disponible actuellement est l'arrachage des clones les plus sensibles. Cependant, le nombre de clones touchés par la maladie ne cesse d'augmenter et il devient de plus en plus difficile de proposer des clones à la fois tolérants et aptes à la production. Les causes épidémiologiques du développement de la maladie (évolution et/ou la migration des populations de *C. cassiicola*, modification des conditions environnementales, etc) sont encore inconnues.

Des observations en plantation ont montré que des clones décrits comme tolérants dans certains pays s'avéraient très sensibles dans d'autres (GT 1, PB 260, RRIM 600...) laissant supposer l'existence de races de *C. cassiicola* bien différenciées, avec des préférences clonales distinctes. La sélection de clones tolérants ou résistants à l'ensemble des races de *C. cassiicola* et/ou la mise au point de méthodes de lutte écologiques est donc devenue une nécessité. Cependant, il est important d'approfondir nos connaissances concernant la spécificité parasitaire de ce champignon (son mode trophique, sa diversité, sa spécificité d'hôte ou ses préférences clonales...) afin de développer des méthodes de lutte adaptées.

La plupart des descriptions concernant *C. cassiicola* font état d'un fonctionnement de type pathogène nécrotrophe, mais des formes saprophytes ont également été décrites, de même que des formes endophytes chez certaines plantes. Dans le cas de l'hévéa, au démarrage de cette étude, *Corynespora cassiicola* était connu exclusivement comme agent pathogène nécrotrophe. Comme il a été décrit dans la synthèse bibliographique précédente, les interactions entre plantes et agents pathogènes nécrotrophes peuvent faire intervenir des effecteurs hôte-spécifiques protéiques (issus de la synthèse ribosomale) qui, en présence de gènes dominants de sensibilité dans l'hôte, entraînent la maladie (ETS). Dans le cas de l'interaction hévéa/ *C. cassiicola*, la découverte de la cassiicoline, petite protéine sécrétée qui semble jouer un rôle déterminant dans le pouvoir pathogène de *C. cassiicola*, suggère fortement que l'on est dans un cas d'interaction plante/agent pathogène nécrotrophe faisant intervenir un effecteur spécifique conduisant à l'ETS. Cependant de nombreuses zones d'ombre persistent. Le clonage du gène codant pour la cassiicoline, préalable à cette étude, a ouvert de nouvelles perspectives pour appréhender les mécanismes de l'interaction *C. cassiicola*/hévéa.

L'interrogation majeure de l'Institut Français du Caoutchouc (IFC), à l'origine de ce travail de thèse, concernait le développement d'un biotest basé sur la cassiicoline purifiée afin de tester la sensibilité des clones d'hévéa à la maladie. Des travaux antérieurs avaient montré une bonne concordance entre la sensibilité des clones au champignon (inoculé sous forme de suspension conidienne) et la toxine purifiée. Cependant, ces travaux étaient limités à un seul isolat et une question subsistait : **la cassiicoline est-elle le seul effecteur de pathogénie de *C. cassiicola* sur l'hévéa ?** Afin de répondre à cette interrogation et pour progresser dans la compréhension des mécanismes de l'interaction *C. cassiicola*/hévéa, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs spécifiques.



Une première étude (Chapitre I) portant sur trois isolats d'agressivité contrastée (respectivement faible, moyenne et forte) avait pour objectif de déterminer si des variations qualitatives dans la séquence ou la structure de la cassiicoline, et/ou des variations quantitatives dues à des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène de cassiicoline, pouvaient expliquer les différences d'agressivité des souches.

Une deuxième étude (Chapitre II) s'est focalisée sur des isolats de *C. cassiicola* découverts au cours de cette thèse dans des feuilles asymptomatiques d'hévéa provenant du Brésil. La maladie CLF ne s'étant jamais déclarée sur hévéa en Amérique latine et aucune forme endophytique n'ayant été décrite au préalable sur cet hôte, une étude approfondie de ces isolats était justifiée. Elle avait comme objectif de préciser l'implication de la cassiicoline dans l'interaction *C. cassiicola*/hévéa, en fonction des différents modes trophiques du champignon.

La troisième étude (chapitre III), avait pour objectif d'analyser la diversité des gènes codant pour la cassiicoline, à partir d'une collection de souches de *C. cassiicola* provenant de différentes origines géographiques (Asie, Afrique, Amérique) prélevées principalement sur hévéa et de relier l'éventuelle diversité des profils toxiques avec la diversité des profils de pathogénie.

# *CHAPITRE 1*

**Characterization of a cassiicolin-encoding gene from  
*Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree  
(*Hevea brasiliensis*)**

Publié dans Plant Science (2012) 185-186: 227-237



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/plantsci](http://www.elsevier.com/locate/plantsci)

## Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

Marine Déon<sup>a,b</sup>, Yanice Bourré<sup>c</sup>, Stéphanie Gimenez<sup>c,e</sup>, Angélique Berger<sup>c</sup>, Daniel Bieysse<sup>e</sup>, Frédéric de Lamotte<sup>d</sup>, Joël Poncet<sup>f</sup>, Véronique Roussel<sup>e</sup>, François Bonnot<sup>e</sup>, Gérald Oliver<sup>c</sup>, Jérôme Franchel<sup>b</sup>, Marc Seguin<sup>c</sup>, Thierry Leroy<sup>c</sup>, Patricia Roeckel-Drevet<sup>b</sup>, Valérie Pujade-Renaud<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand Cedex, France

<sup>c</sup> CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

<sup>d</sup> INRA, UMR AGAP, F-34060 Montpellier, France

<sup>e</sup> CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

<sup>f</sup> Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université de Montpellier 1, Université de Montpellier 2, F-34094 Montpellier, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 September 2011

Received in revised form 17 October 2011

Accepted 21 October 2011

Available online 25 October 2011

#### Keywords:

*Hevea brasiliensis*

*Corynespora cassiicola*

Cassiicolin

Toxin

Disease effector

Gene

### ABSTRACT

*Corynespora* Leaf Fall (CLF) is a major disease of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) caused by the *Ascomycota* *Corynespora cassiicola*. Here we describe the cloning and characterization of a gene encoding cassiicolin (Cas), a glycosylated cysteine-rich small secreted protein (SSP) identified as a potential CLF disease effector in rubber tree. Three isolates with contrasted levels of aggressiveness were analyzed comparatively. The cassiicolin gene was detected – and the toxin successfully purified – from the isolates with high and medium aggressiveness (CCP and CCAM3 respectively) but not from the isolate with the lowest aggressiveness (CCAM1), suggesting the existence of a different disease effector in the later. CCP and CCAM3 carried strictly identical cassiicolin genes and produced toxins of identical mass, as evidence by mass spectrometry analysis, thus suggesting conserved post-translational modifications in addition to sequence identity. The differences in aggressiveness between CCP and CCAM3 may be attributed to differences in cassiicolin transcript levels rather than qualitative variations in cassiicolin structure. Cassiicolin may play an important role in the early phase of infection since a peak of cassiicolin transcripts occurred in 1 or 2 days after inoculation (before the occurrence of the first symptoms), in both the tolerant and the susceptible cultivars.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei is a fungal phytopathogen found in more than 300 plant species (Fungal Database, 2011, <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>), causing major economic losses in tropical and subtropical areas. It is an *Ascomycota* belonging to the *Dothideomycetes* and forming with *Corynespora smithii* a separate phylogenetic clade among the *Pleosporales* [1]. In rubber tree, *C. cassiicola* is the causal agent of the *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease, which ranks among the most important cryptogamic diseases of rubber plantations. *C. cassiicola* was first isolated from rubber trees in Sierra Leone in 1936, then in India and Malaysia in the early sixties [2,3]. Since then, the disease has rapidly spread over most rubber producing countries in

Asia and Africa, causing severe sporadic epidemics and important losses in natural rubber yields.

Although most of the reported *C. cassiicola* isolates are described as pathogens, the trophic capabilities within *C. cassiicola* are very diverse, with endotrophic and saprotrophic forms also being reported [4]. In rubber tree, *C. cassiicola* is known as a necrotrophic pathogen colonizing the plant through the secretion of phytotoxic compounds [5–7]. Isolates from rubber tree are able to infect other plants following a selective host range [8]. In addition, the symptoms intensity induced by a given isolate varies following specific cultivar preferences [7].

A secreted toxin, named cassiicolin, was purified from the isolate CCP collected from rubber plantations in Philippines [7–9]. It is a glycosylated protein of 27 amino acids with a compact three-dimensional structure knitted by three disulfide bonds [7–9]. The sugar moiety, located on the second amino acid, was identified as a methyl-mannose. However, no informative sequence homology could be found and the mode of action of the toxin remains so far unknown. Application of purified cassiicolin or spore inoculation

\* Corresponding author at: CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France.  
E-mail address: [valerie.pujade-renaud@cirad.fr](mailto:valerie.pujade-renaud@cirad.fr) (V. Pujade-Renaud).

(isolate CCP) resulted in the same symptoms [8]. The sensitivity of 51 rubber cultivars to the purified cassiicolin was in good agreement with their susceptibility to the fungus (strain CCP) evaluated 3 days after inoculation [7]. Moreover, symptoms were reduced when antibodies directed against cassiicolin were added to the spore suspension before inoculation [7]. All these data showed that cassiicolin was a probable disease effector of *C. cassiicola* in rubber tree. The toxicity of the culture filtrates from four different isolates and the amount of cassiicolin produced (estimated by ELISA dot-blot) were in agreement, and the authors proposed that the interaction between *C. cassiicola* and rubber tree may follow a quantitative model according to which the amount of toxin produced by various isolates on a given cultivar would determine their aggressiveness.

In this paper, we present the cloning and characterization of the first identified cassiicolin-encoding gene, as well as a comparative analysis among three contrasted *C. cassiicola* isolates: (i) aggressiveness was analyzed by spore inoculation and filtrate toxicity on detached leaves; (ii) toxins were purified, analyzed by mass spectrometry and evaluated for their toxicity; (iii) presence of the cassiicolin gene was analyzed by PCR and Southern blotting; (iv) cassiicolin gene expression was analyzed both *in vitro* and *in planta*. Our first objective was to investigate the hypothesis that qualitative variations in the sequence or structure of the toxin produced by various isolates may also impact their pathogenicity or virulence. Secondly, we investigated whether transcriptional regulation of the cassiicolin gene may account for differences in aggressiveness between two isolates on a given cultivar.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

*C. cassiicola* isolates originated from rubber plantations in Philippines (isolate CCP) and Cameroun (isolates CCAM1 and CCAM3). They were isolated from single conidium and verified by sequencing of the PCR-amplified fragments of the ribosomal genes using primers ITS1 and ITS4 [10].

The mycelium was cultivated on PDA medium (Potato Dextrose Agar, DIFCO), at 25 °C in the dark. For toxin production, the mycelium was grown in 100 ml modified Czapek-Dox medium for 7, 14 or 21 days, at 25 °C (photoperiod: 12 h) as previously described [9]. The mycelium was collected by filtration through Whatman paper, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. The filtrate was filter-sterilized through 0.22 µm Millipore membranes, under sterile laminar flow, and stored at 4 °C.

### 2.2. Inoculation

*C. cassiicola* conidia were collected from 7 days old mycelium cultures and resuspended in sterile water supplemented with 0.02% Tween20 (5000 conidia/ml). Drops of conidia suspension (20 µl per drop, 10 drops per leaf) were applied on the abaxial surface of detached rubber tree leaves in the developmental stage C [11]. For each cultivar/isolate couple, six leaves were inoculated (60 drops in total). The inoculated leaves were maintained in a moist environment at 25 °C, for 24 h in the dark then under alternate light (photoperiod 12 h). Symptoms intensity was scored 9 days after spore inoculation. For each drop, five levels of damage were distinguished: 0, no symptom; 1, pinpoint necrosis; 2, coalescent necrotic spots covering less than 50% of the drop surface; 3, the necrosis surface represents 50–100% of the drop surface; 4, the necrosis surface represents 100–200% of the drop surface; 5, the necrosis surface represents more than 200% of the drop surface. A severity index

per leaf ( $SI_L$ ) was calculated as follows ( $kx$  being the number of spots in class  $x$ ):

$$SI_L = k1 + (2 \times k2) + (3 \times k3) + (4 \times k4) + (5 \times k5)$$

For each isolate/cultivar couple, the final SI value was the mean of all  $SI_L$  for at least 3 biological replicates.

### 2.3. Toxicity of the culture filtrates

The “leaf puncture bioassay” [7] was used to estimate the toxicity of the culture filtrates. This test was performed on detached leaves of the rubber tree cultivar PB 260, in the developmental stage C [11]. Four drops of culture filtrate (20 µl) were applied on the abaxial surface of the leaf, after slight scrapping of the epidermis (over 1 mm<sup>2</sup>). Drops of modified Czapek-Dox medium were used as control. After incubation for 3 days at 25 °C under controlled light intensity (50 µmol/m<sup>2</sup>/s, photoperiod 12 h) in a moist environment, the surface of necrotic tissues was measured. As chlorophyll degradation in dying cells generates fluorescent catabolites [12], the leaves were observed under UV (365 nm) and the fluorescing tissues were delineated with a marker pen. After scanning, the delineated surface was measured using Optimas 6.1 (VSG, UK).

For each leaf, the surface of necrotic tissue was a sum from the four drops. Ten leaves were used for each isolate/cultivar couple. For each isolate/cultivar couple, the surface of necrotic tissue was a mean from 10 leaves.

### 2.4. Cassiicolin purification

Cassiicolin purification was conducted as previously described [9]. The sterile filtrate was first pasteurized at 45 °C to reduce its viscosity and neutralized by adding 1/3 volume of 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. It was then submitted to reverse phase chromatography (RPC) using GE-HealthCare Source 15 RPC (1 cm × 8.5 cm) equilibrated with buffer A (KHPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7). Elution was performed by a linear gradient (20 column volumes, 4 ml min<sup>–1</sup>) from buffer A to buffer B (buffer A with 70% acetonitrile). The toxicity of the eluted fractions was monitored by leaf-puncture bioassay on PB 260 detached leaflets, after partial evaporation of the fractions (to half of the initial volume) in order to eliminate the acetonitrile. The toxic fractions were pooled and concentrated by a second run on GE-HealthCare Source 15 RPC in similar conditions except that the elution was done in three column volumes. The toxic fraction was identified by bioassay and submitted to size exclusion chromatography on a GE-Healthcare Superdex 30 Prep-Grade (1.6 cm × 60 cm) equilibrated with buffer C (KHPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7, acetonitrile 10%, pH 7) and eluted at 1 ml min<sup>–1</sup>. Elution of the toxin was monitored by bioassay, after partial evaporation. A final concentration step was performed on GE-HealthCare Source 15 RPC and purified toxin was conserved at 4 °C.

### 2.5. Mass spectrometry

Nanoelectrospray mass spectrometry was performed as described previously [9], on a Quadrupole Time-Of-Flight (Q-TOF) mass spectrometer (QSTAR Pulsar-i, Applied Biosystems, Foster City, CA) fitted with a Protana nanospray inlet system (Protana, Odense, Denmark). Spectra were recorded using the Analyst QS software (Applied Biosystems). Parameters were adjusted as follows: ion spray voltage (IS), 900 V; curtain gas (CUR), 25; declustering potential (DP), 10–45 V; focusing potential (FP), 265 V; declustering potential 2 (DP2), 15 V. Fragmentation experiments (CID) were performed in the collision cell using nitrogen gas on the doubly or triply charged ions detected, with a collision energy profile optimized individually (20–65 V). Before being placed in

the source tip holder, capillaries (Protana, Odense, Denmark) were loaded with the desalted samples according to a described procedure. A 2  $\mu$ l aliquot of chromatographically purified cassiicolin was loaded on Poros 20 R2 (Applied Biosystems) packed in a gel-loader pipette tip, washed with 1% formic acid (2  $\mu$ l) and eluted with 2  $\mu$ l of 50:50:1 methanol/water/formic acid.

## 2.6. Cloning of the cassiicolin cDNA and gene

A cassiicolin cDNA fragment was first obtained by RT-PCR amplification using various combinations of degenerated primers designed from the cassiicolin amino acid sequence (Swiss-Prot: P84902.1).

Total RNA was extracted from 100 mg of ground lyophilized mycelium (isolate CCP) using the Trizol RNA extraction procedure (Invitrogen, Paisley, UK) and treated with DNase I (Fermentas, St-Rémy-lès Chevreuse, France), following the manufacturer's recommendations. Five micrograms of total RNA were reverse-transcribed using 1  $\mu$ l (200 u) RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), with oligo-dT-VN as primer, 1 mM mixed dNTPs and 20 u Riboblock in RevertAid buffer (Fermentas). After incubation at 42 °C for 1 h, the enzyme was heat-inactivated at 70 °C for 10 min.

Four sets of degenerated primers were designed from the cassiicolin amino acid sequence. As the domain covered by the primers contained a serine (six possible codons), two versions of primers were designed, with "tcn" or "agy" respectively as serine codon. The forward primers CasF1 (acntgygtntcntgygt) and CasF6 (acntgygt~~na~~gytgygt) covered the N-terminal sequence TCVSCV of the protein, and differed in the serine (S) codon only (bold letters). The reverse primers CasR1 (rcanccngarcangccca) and CasR6 (rcanccrctrcangccca) covered the C-terminal sequence WACSGC of the protein and differed also in the serine (S) codon. PCR amplification was performed using the Taq CORE Kit 25 (Q-BIOgene), with 1  $\mu$ l of the previous reverse-transcription mix, 2.5 nM of each primer, 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M of each dNTP and 0.5 U of Taq DNA polymerase, for 30 cycles (30 s at 93 °C, 30 s at 46 °C, 30 s at 72 °C). Only the primers containing the "agy" serine codon (CasF6 and CasR6) successfully amplified a cDNA fragment corresponding to cassiicolin.

Specific primers internal to this cDNA fragment (SI 1) were then designed to amplify the 5' and 3' ends of the cassiicolin cDNA by RACE-PCR, using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech-Takara, Saint-Gernain-en-Lay, France). For 5' end amplification, 500 ng of DNase I-treated total RNA was reverse-transcribed using oligo-dT-VN as primer (10  $\mu$ M), in the presence of SMART II A oligonucleotide (1.2  $\mu$ M), according to the manufacturer's recommendations. PCR amplification was performed using the Advantage 2 PCR kit (Clontech), with 1.5  $\mu$ l of diluted first-strand cDNA mix as template, 5' PCR primer II A (0.2  $\mu$ M) and CasSP2-R (0.2  $\mu$ M) as forward and reverse primer respectively, for 25 cycles under the following conditions: 45 s at 94 °C, 45 s at 65 °C and 45 s at 72 °C. Amplification of the 3' end was performed as above except for reverse transcription that was primed with the 3' SMART CDS primer II A, without addition of SMART II A oligonucleotide; PCR amplification was performed with CasSP1-F (0.2  $\mu$ M) and 5' PCR primer II A (0.2  $\mu$ M) as forward and reverse primer respectively. The amplification products were ligated in the pGEMT-easy plasmid then transferred into Electro Max DH10B Phage Resistant bacteria (Invitrogen). Plasmids were extracted from 16 isolated colonies and the inserts were sequenced.

Amplification of the full length cassiicolin gene and cDNA was performed using the primers CasF9 and CasR16, designed from the RACE-amplified 5' and 3' ends of the cDNA sequence respectively. Template was either 100 ng of genomic DNA extracted as described previously [13], or 1  $\mu$ l reverse-transcribed RNA primed with

oligo-dT-NV as described above. Amplification was performed using the Advantage 2 PCR kit (Clontech), for 30 cycles under the following conditions: 45 s at 93 °C, 45 s at 62 °C, 1 min 30 at 72 °C.

## 2.7. Bioinformatics

Sequencing was performed by GATC-Biotech. Sequence annotation was conducted using the VectorNTI suite 10 tools or the Genious Pro suite, version 5.1.7 (Biomatters, Ltd.). Homology searches were performed using blastn, and blastp algorithms [14] against the NCBI (nr) sequence databases as well as public genomic databases for ascomycetes and basidiomycetes, with a *E*-value cut-off of  $1 \times 10^{-5}$ . Prediction of the signal peptide was performed using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, [15]). The program TMHMM version 2.0 was used to check for the presence of transmembrane spanning regions (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). The ProtComp program (version 9.0; <http://www.softberry.com>) was used to confirm subcellular localization. Sequence alignments were performed using the Genious alignment program under Genious Pro 5.1.7.

## 2.8. Cassiicolin gene detection in the selected isolates

Duplex-PCR detection of both the cassiicolin gene and a reference actin gene was conducted on all four selected isolates: CCP (as positive control), CCAM3 and CCAM1. The actin primers (CcActin-F and CcActin-R, see [Supplementary Information](#)) were designed from a *C. cassicola* actin gene (unpublished). The cassiicolin primers (CasF12 and CasR19, see [Table 1](#)) were located in the mature cassiicolin domain, framing intron 2. Template was 100 ng of genomic DNA. Amplification was conducted for 30 cycles under the following conditions: 45 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, 45 s at 72 °C. A second PCR amplification was conducted with the primers CasF9 and CasR16 ([Supplementary information Si.1](#)) to amplify the whole gene. PCR conditions were as previously described for CCP (30 cycles: 45 s at 93 °C, 45 s at 62 °C, 1 min 30 at 72 °C).

## 2.9. Cassiicolin gene expression analysis

*In vitro* expression: Mycelium from *C. cassicola* cultures in modified Czapek-Dox medium (isolates CCP and CCAM3) was collected after 7, 14 and 21 days of culture and lyophilized. Each time-point was analyzed with two technical repetitions.

*In planta* expression: Detached leaves were inoculated with conidia (5000 conidia/ml) from either CCP or CCAM3. Leaf fragments (1.77 cm<sup>2</sup>) were collected at each inoculation spot: just after inoculation, then 24 h, 48 h, 5 days and 9 days post-inoculation. Controls were fragments from leaves inoculated with water supplemented with 0.02% Tween20. For each condition, two sets of inoculated fragments (five leaf fragments per set) were analyzed independently (two biological repeats).

RNA was extracted (Concert™ Plant RNA Reagent, Invitrogen), treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega, France) and reverse-transcribed using SuperScript III reverse-transcriptase (Invitrogen). Real-time RT-PCR amplification was performed in an iCycler MyiQ (Bio-Rad) using the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Angers, France), which provides SYBR green as fluorescent dye. The primers used to amplify the cassiicolin transcripts were CasF12 and Cc-qCas1-R2, with the reverse primer overlapping exon 2 splicing sites, to avoid amplification of residual genomic DNA. These primers amplify a 74 bp fragment from the cassiicolin cDNA. The reference gene used to normalize cassiicolin gene expression was a *C. cassicola*-specific EF1 $\alpha$  gene (unpublished). The primers used to amplify the EF1 $\alpha$  transcripts were Cc-qEF1 $\alpha$ -F1 and Cc-qEF1 $\alpha$ -R1, with the reverse primer also overlapping an intron site. They amplify a 114 bp fragment from the



**Table 1**  
Virulence of three *C. cassiicola* isolates (CCP, CCAM1 and CCAM3) on eight rubber tree cultivars.

Cultivars	Severity indexes (SI)						Mean SI per cultivar	
	CCP		CCAM3		CCAM1			
PB 217	40.79	a	36.00	ab	26.04	efg	34.52	A
IRCA 19	39.59	ab	36.07	abc	22.29	efghi	34.69	AB
PB 260	38.04	ab	37.92	ab	14.15	ijkl	31.65	AB
PB 235	42.52	a	27.75	def	17.83	hijk	31.31	B
RRIC 100	40.81	ab	22.56	fgh	8.44	lm	26.57	C
RO 38	34.37	bcd	20.48	ghig	14.10	jkl	24.94	C
RRIM 600	29.55	cde	18.56	hijk	18.33	hijk	23.54	C
IAN 6546	18.22	hijk	4.67	m	11.11	klm	11.93	D
Mean SI per isolate	36.62	A	25.84	B	17.37	C		

SI = severity indexes recorded nine days after spore inoculation. Mean SI = mean of all “severity indexes per leave (SI<sub>L</sub>)”, per cultivar (last column) or per isolate (last line). Data were analyzed using ANOVA and Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ). Different capital letters in the last column (mean SI per cultivar) indicate that the corresponding cultivars are significantly different in terms of susceptibility. Different capital letters in the last line (mean SI per isolate) indicate that the corresponding isolates are significantly different in terms of aggressiveness. Different small letters indicate that the severity indexes of the corresponding “cultivar/isolate” couples are significantly different. Avirulence: SI < 10.

EF1 $\alpha$  cDNA. Both cassiicolin and EF1 $\alpha$  primers failed to amplify any cDNA product from non-inoculated leaves, while generating a band of the expected size on *C. cassiicola* cDNA, which confirmed their specificity. PCR were run in triplicate for 40 cycles (15 s at 95 °C, 20 s at 62 °C, 20 s at 72 °C). The cassiicolin gene relative expression was calculated using the following formula [16],  $E$  being the primers efficiency, “target” referring to cassiicolin and “ref” to EF1 $\alpha$ :

$$\text{Relative expression} = \frac{(1 + E_{\text{target}})^{\Delta \text{Ct}_{\text{target}}}}{(1 + E_{\text{ref}})^{\Delta \text{Ct}_{\text{ref}}}}$$

## 2.10. Southern blot analysis

Genomic DNA (2  $\mu$ g) was restricted overnight using four restriction enzymes *Eco*R1, *Hind*III, *Xho*I and *Bam*HI, which do not cut within the pro-cassiicolin gene sequence. Digested gDNA was separated on agarose gel, and then transferred onto a positively charged nylon membrane. The probe used was a 32P-labelled 128 bp fragment of the cassiicolin-encoding gene (isolate CCP) amplified within the mature cassiicolin domain using the CasF12 and CasR19 primers. Washing was performed at 65 °C in solutions of decreasing salt concentration, with final washing at low stringency (0.5 $\times$  SSC and 0.1 $\times$  SDS) in order to potentially reveal divergent forms of the cassiicolin gene.

## 2.11. Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) were performed with the statistical software R, version 2.10.1 [17]. Differences were tested using Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test ( $P < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Cloning of the cassiicolin-encoding gene and cDNA

A cassiicolin cDNA fragment was first obtained by RT-PCR amplification using degenerated primers designed from the cassiicolin amino acid sequence (isolate CCP). The 5' and 3' ends were then amplified, by RACE-PCR. Finally, the full length cDNA and gene were amplified and sequenced. Fig. 1 shows the structure of the cassiicolin-encoding gene with alignment of the deduced amino acid sequence and nucleotide sequence. The gene contains a 58 amino acid open reading frame organized in two domains. The N-terminal domain includes a 17 amino acid putative signal peptide (identified using SignalP and TargetP programs) followed by a 14 amino acid linker region. The 27 amino acid C-terminal domain is identical to the purified active cassiicolin sequence. It is interrupted

by two introns with typical eukaryotic splice junctions, 5'(-GT) and 3'(-AG). The calculated mass of the whole deduced amino acid sequence was 5.89 kDa. No transmembrane spanning region could be identified using the TMHMM program. The ProtComp program used for identifying sub-cellular location (of animals and fungi protein) predicted an extracellular location (secretion). The C-terminal domain corresponding to the mature cassiicolin was also predicted to be extracellular. All these data predicting secretion are in agreement with the presence of the active protein in the culture filtrate.

A 1191 bp sequence was obtained by primer extension (genome walking) upstream the first identified start codon (data not shown). No other ORF could be identified in positive orientation, confirming the position of the first *atg* codon as indicated in Fig. 1.

The gene and mRNA sequences (*Cas*) were registered in the public sequence databases (GenBank ID: EF667973 and EF667974, respectively). At the time of their release, they were the first cassiicolin-encoding sequences described. Subsequently, a new gene (CT1) encoding a cassiicolin variant from a *C. cassiicola* isolate infecting rubber tree in China was registered by Liu et al. (unpublished; GenBank ID: GU373809). The original pro-cassiicolin gene and CT1 share 87% nucleic sequence identity over 580 bp, with eight gaps. Alignment of the CT1-deduced amino acid sequence with the original pro-cassiicolin revealed 84% identity (50/59) and 89% similarity (53/59), with one additional residue. The 2 substitutions located in the mature cassiicolin domain were positive substitutions.

Beside the CT1 cassiicolin variant, no sequence homology to cassiicolin could be found when searching NCBI sequence databases (nr) or specialized fungal genomic databases for a number of *Ascomycota* and *Basidiomycota* (Duplessis, personal communication).

### 3.2. Comparative virulence of three *C. cassiicola* isolates

Three *C. cassiicola* isolates (CCAM1, CCAM3 and CCP, from which cassiicolin was initially purified and characterized) collected in rubber plantations were compared for their virulence on rubber tree, by analyzing the extent of symptoms induced after application of either conidia or sterile culture filtrate.

Inoculation of detached leaves from eight rubber cultivars with conidia suspensions demonstrated contrasted levels of aggressiveness among the three isolates, with a gradient of susceptibility among the cultivars (Table 1). The mean severity indexes (SI) per isolate were found significantly different ( $P < 0.05$ ). Isolate CCP was globally the most aggressive, with medium to very high severity indexes (SI) for all cultivars except for the resistant cultivar IAN 6546 (IS = 18.22). In average, CCAM3 was significantly less

```

1  tactttttctt aagtatcatc aattccaaat cttgaaaatc tgtcctatac
51  atttgctaca caatgaaata tctccctatc ctcactctctg cttttgtagc
      M K Y L P I L I S A F V A
101 agccgttgct gcagccccgc aagatccgtc tgctgtggca cctgtactcc
      A V A A A P Q D P S A V A P V L
151 ctagacagac ttgcgtacgt cttgactcac aaaagcgcca ttagaaaaga
      P R Q T C
201 gatgaaaagg ttgtagctaa taattagtaa aggtaagctg tgtcaatttc
      V S C V N F
251 ggcaatgggt tttgtggcga taactgtggg aattcttggg ctgtaagtgc
      G N G F C G D N C G N S W A
301 tttgtctggt tctcaaactc aaagctaatt tgcattgcagt gttcgggatg
      C S G C
351 ttaacttttg tagcattcca aagaattgcg gccacaaga tagtgtagct
401 tgaatatattg agctagctgc cgctacaagt ctataggatg gcaaccttag
451 ctacctatac gcaagtctct tgctcctagg ttgttttagac cgatttaaat
501 gttatgtgta tataattagc gctacatata caccacactc ctttacatac
551 acaaatttat actcttacgg atcc
    
```

**Fig. 1.** Sequence of the cassiicolin precursor (Cas) gene. The deduced amino acid sequence is indicated in capital letters below the nucleotide sequence, with the mature cassiicolin domain in bold letters. The sequence corresponding to the signal peptide is underlined. The start codon is in italic letters. Sequence registered under GenBank ID: EF667973.

aggressive than CCP, although this difference was found not significant on the highly susceptible cultivars (PB217, IRCA19 and PB 260). Isolate CCAM1 was globally the less aggressive, with most cultivars considered tolerant ( $10 < SI < 30$ ) or even resistant ( $SI < 10$ ) to this isolate.

The three isolates were then compared for the toxicity of their culture filtrate on the highly susceptible cultivar PB 260 and the tolerant cultivar RRIM 600 (Fig. 2). PB 260 was significantly more sensitive than RRIM 600 ( $P < 0.05$ ), whether in interaction with CCP or CCAM3. However, this difference was found not significant in interaction with CCAM1. On PB 260, a gradient in toxicity was

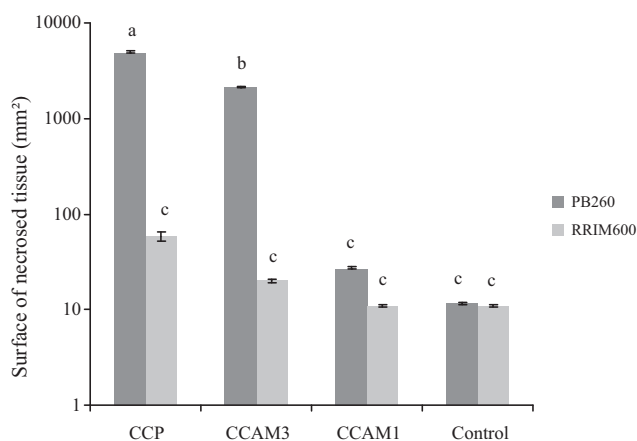
observed among the three filtrates, with the highest toxicity for CCP, slightly but significantly lower toxicity for CCAM3 ( $P < 0.05$ ), and the lowest toxicity (not significantly different from the control) for CCAM1. On the tolerant cultivar RRIM 600, the toxicity of all three filtrates was found not significantly different from that of the control. However, when statistical analysis was repeated on the RRIM 600 data set only, CCP filtrate was confirmed significantly more toxic than the other two filtrates ( $P < 0.05$ ), which were not themselves significantly different from the control (not shown).

### 3.3. Biochemical purification of the toxin and mass spectrometry

Biochemical purification of the toxins from 21 days-old culture filtrates of the three isolates was attempted following the previously published protocol [9], which involves mainly two steps: reverse phase chromatography and size exclusion chromatography. The reverse phase chromatography profiles, although highly reproducible over several runs using the same culture filtrate, differed significantly from one fungal isolate to another (Supplementary Information Si.2 A and B). Monitoring of the toxicity through bioassays was necessary to identify the toxic fractions, considering that the active molecule could differ qualitatively from one isolate to another. Size exclusion chromatography of the toxic fractions generated one major peak containing the active molecule (Supplementary Information Si.2C and D).

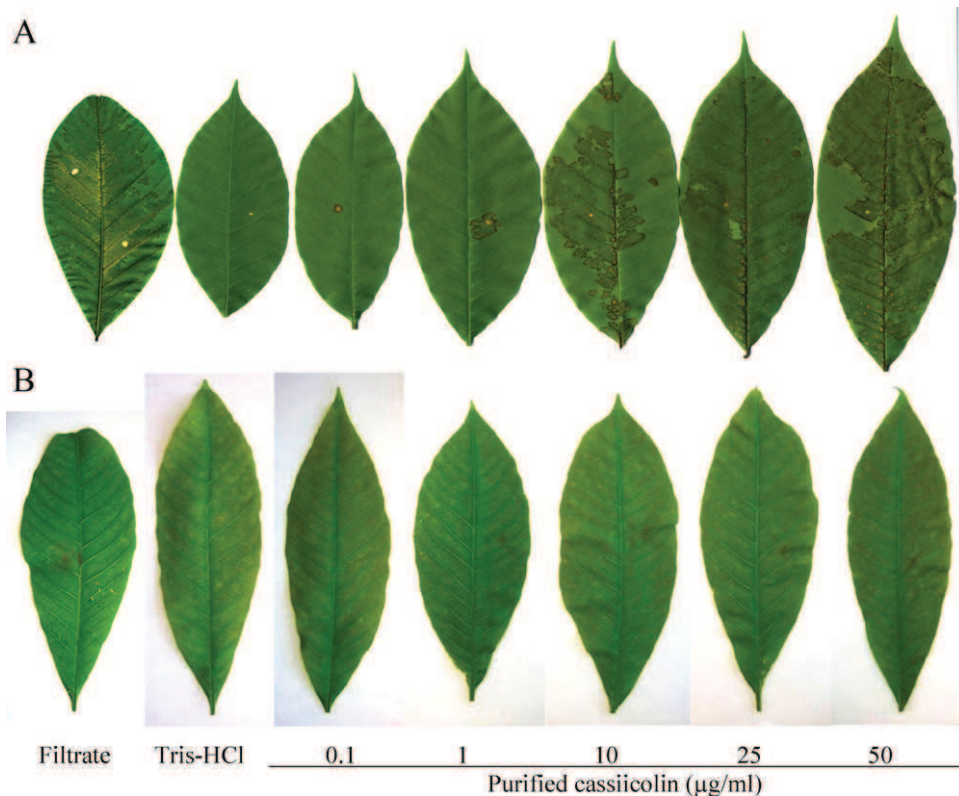
The whole purification process was fulfilled with success for both CCP and CCAM3 isolates but it could not be completed for CCAM1. Although slightly toxic fractions were detected after reverse phase chromatography of the CCAM1 filtrate, no more toxicity was detected after these fractions were submitted to size exclusion chromatography.

Mass spectrometry by ESI-QTOF of the toxic molecules purified from CCP and CCAM3 revealed that both had the same molecular mass of 2884.96 Da, while the calculated mass deduced from the amino acid sequence of the mature cassiicolin domain was



**Fig. 2.** Phytotoxicity of 21 days-old culture filtrates from 3 isolates (CCP, CCAM3 and CCAM1) tested on detached leaves from the cultivars PB260 and RRIM600. Bioassay conditions: four drops of filtrate (20 µl) per leaf, with ten leaves per treatment. Controls were performed with drops of Czapek-Dox medium. Phytotoxicity was expressed as the mean surface of necrosed tissue per leaf (mm²), in Log scale. The data presented are the means from 10 leaves  $\pm$  standard errors. Data were analyzed using ANOVA. Different letters indicate significant differences in terms of phytotoxicity according to Tuckey's HSD test ( $P < 0.05$ ).





**Fig. 3.** Phytotoxicity of the purified cassiicolin. Diluted aliquots of the purified toxin (from isolate CCP), at estimated concentrations of 0.1, 1, 10, 25 and 50 µg/ml, were applied on detached leaves of cultivars PB 260 (A) and RRIM 600 (B) following the “leaf puncture bioassay” procedure. Tris–HCl 10 mM and crude culture filtrate were used as control. Symptoms were observed after 72 h.

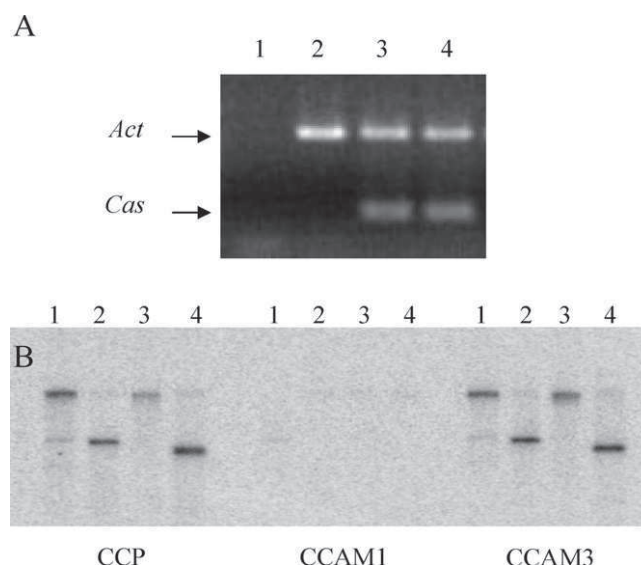
2.73 kDa. The difference corresponds to the expected mass of the sugar moiety (alpha-methyl mannose) described previously for CCP [8,9]. This result indicates that the CCP and CCAM3 toxins are identical, not only in terms of primary amino acid sequence but also in terms of post-translational modifications.

Fig. 3 presents the symptoms observed after application of sequentially diluted aliquots of the purified toxin from isolate CCP (at estimated concentrations ranging from 0.1 µg/ml to 50 µg/ml), on the cultivars PB 260 (susceptible) and RRIM 600 (tolerant). In PB 260, the surface of necrotic tissue clearly correlates with toxin concentration, with the first symptoms visible at the lowest concentration tested. In RRIM 600, necrosis became visible at a concentration of 1 µg/ml, extending also with concentration, although it remained very limited (<0.3 cm<sup>2</sup> at the highest concentration), in proportion similar to that induced by the crude culture filtrate. Similar results were obtained with the toxin purified from CCAM3, at equivalent concentrations (data not shown). At equal toxin concentration, toxicity is very marked in PB 260 but moderate in RRIM 600, clearly demonstrating that sensitivity to the toxin is cultivar-dependent. In addition, toxicity in a given cultivar appears to be proportional to the amount of toxin applied. However, it cannot be extrapolated that aggressiveness (of various isolates in a given cultivar) depends on the amount of toxin produced *in planta*, since the doses applied in this assay may not reflect the physiological concentrations produced by the fungus during the plant infection.

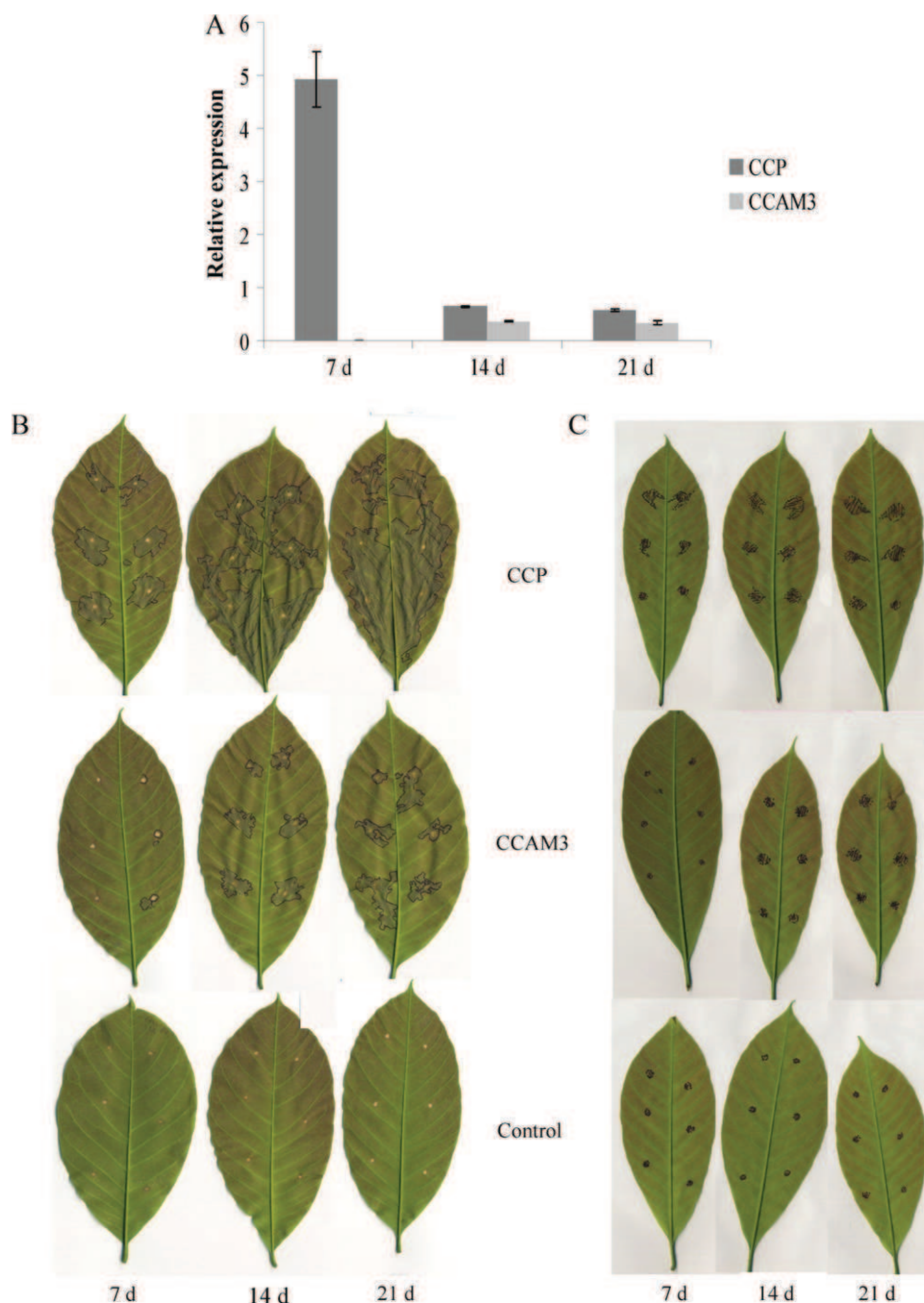
#### 3.4. Detection of the cassiicolin gene in isolates CCP, CCAM1 and CCAM3, by PCR and Southern blotting

Fig. 4A shows duplex PCR amplification from genomic DNA of the isolates CCP, CCAM1 and CCAM3 using one set of primers (CasF12/CasR19) designed from the CCP cassiicolin gene sequence. It amplified bands of identical size (128 pb) in both CCP and CCAM3

but failed to amplify any band in CCAM1. A second set of primers (CcAct-F/CcAct-R), designed from a *C. cassiicola* actin gene, equally amplified a 165 bp gene fragment in all three samples, demonstrating that the genomic DNA used as template was of comparable



**Fig. 4.** Detection of the cassiicolin gene in the *C. cassiicola* isolates CCAM1, CCAM3 and CCP. (A) PCR detection: cassiicolin-specific primers (CasF12/CasR19) and actin-specific primers (CcActin-F/CcActin-R) were used in duplex PCR reactions. Upper band: 165 bp actin gene fragment (Act). Lower band: 128 bp cassiicolin gene fragment (Cas). Lane 1, negative control; lane 2, CCAM1; lane 3, CCAM3; lane 4, CCP. (B) Detection by Southern blot hybridization: genomic DNA (2 µg) from the *C. cassiicola* isolates CCP, CCAM1 and CCAM3 was restricted with *Eco*RI (lane 1), *Hind*III (2), *Xho*I (3) and *Bam*HI (4) and probed with a 32P-labelled fragment of the cassiicolin gene corresponding to the mature cassiicolin domain.



**Fig. 5.** Kinetics of the cassiicolin gene expression and toxin accumulation during *in vitro* culture. The mycelium and filtrates from CCP and CCAM3 were collected after 7, 14 and 21 days of *in vitro* culture in Czapek-Dox medium. (A) Real-time RT-PCR analysis of the cassiicolin gene expression, in CCP and CCAM3 mycelium. Cassiicolin transcripts levels were detected using primers F12 and Cc-qCas1-R2, with the reverse primer overlapping intron 2 splicing sites. The reference gene used for normalization was a *C. cassiicola*-specific EF1 $\alpha$  gene (unpublished), amplified using the primers Cc-qEF1 $\alpha$ -F1 and Cc-qEF1 $\alpha$ -R1, with the reverse primer also overlapping an intron. The normalized cassiicolin gene expression was calculated at the 3 time-points, for both CCP and CCAM3 isolates. The data are presented means  $\pm$  standard error from two replicates. (B) Toxicity of the culture filtrates on PB 260 detached leaves. The filtrates were diluted three fold with modified Czapek-Dox medium. The necrotic tissue were visualized under UV light and delineated with a marker pen.

quality and quantity in all samples. Thus, failure in detecting the cassiicolin gene in CCAM1, under these conditions, suggested either the absence of cassiicolin gene or mismatching of the primers due to sequence divergence of the target. Six other combinations of primers designed from the cassiicolin gene were tested but all failed to detect cassiicolin isoforms in CCAM1. Amplification with the degenerated primers initially used in CCP for the cloning of a cassiicolin cDNA fragment was also unsuccessful. Finally, amplification using primers specific to CT1 (GU373809), a cassiicolin

homologue, failed to detect this gene in all three isolates (data not shown).

Amplification of the full length cassiicolin gene and cDNA from CCAM3 was performed using the primer set CasF9/CasR16. The PCR products obtained were cloned and sequenced. This revealed that CCP and CCAM3 cassiicolin precursor genes have fully identical nucleotide sequences.

Southern blot hybridization was conducted on the three isolates with a probe corresponding to the mature cassiicolin domain,

with mild washing conditions in order to reveal potential isoforms of cassiicolin (Fig. 4B). The probe for Southern blot was chosen to target the mature cassiicolin domain in order to avoid matching with sequences encoding signal peptides unrelated to cassiicolin. Identical hybridization profiles were observed for CCP and CCAM3, with a major band, likely corresponding to the cassiicolin gene, and a weakly hybridizing band. For CCAM1, only the faint band was detected. Considering the mild washing conditions, the faint bands could likely be due to non-specific hybridization (they were not visible after stringent washing). However, the possible existence of a highly divergent cassiicolin gene homologue cannot be ruled out and will have to be further investigated.

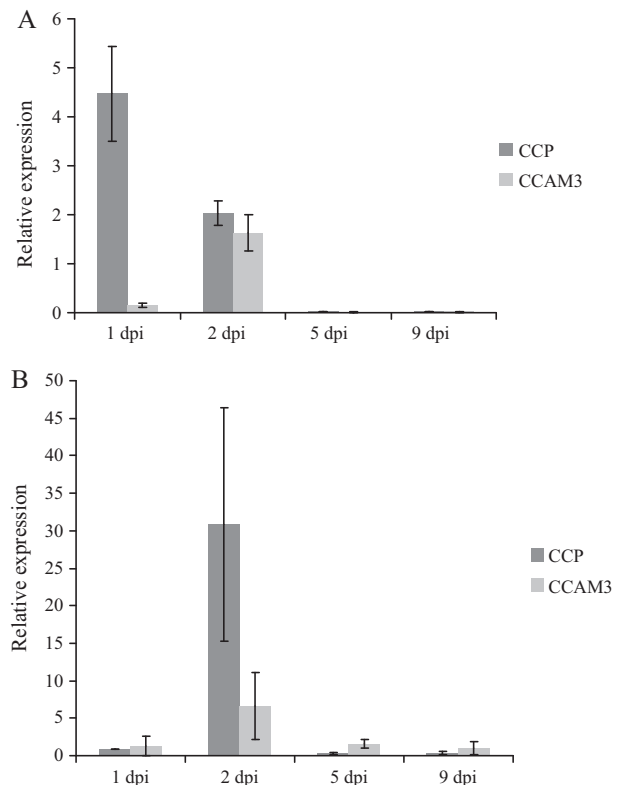
### 3.5. Comparative analysis of the cassiicolin gene expression in CCP and CCAM3

Cassiicolin gene expression was analyzed comparatively for CCP and CCAM3, either in mycelium produced *in vitro* (without interaction with the host plant), or in spore-inoculated leaves. The analysis was performed by real-time RT-PCR, using a *C. cassiicola*-specific EF1 $\alpha$  gene for normalization of the cassiicolin transcript levels. This reference gene reflects the amount of fungal cells in the sample.

**Expression under *in vitro* conditions (Fig. 5):** The mycelium and culture filtrates were concomitantly collected, after 7, 14 and 21 days of *in vitro* culture in liquid medium, and analyzed for gene expression and toxicity respectively. The cassiicolin gene was functionally expressed in the mycelium from both isolates (Fig. 5A). In the 7 days-old cultures, the cassiicolin gene was highly expressed in case of CCP but hardly detectable in case of CCAM3, while in the 14 and 21 days-old cultures, the relative cassiicolin gene expression was low for both isolates. In CCP, cassiicolin gene therefore appears transiently expressed, with preferential expression in the 7 days-old culture compared to the older cultures. Whether CCAM3 also produces a transient peak of expression (for example between day 7 and day 14) is unknown.

Toxicity of the culture filtrates collected at the various time-points was analyzed concomitantly to gene expression analysis, on both the highly sensitive cultivar PB 260 (Fig. 5B) and the tolerant cultivar RRIM 600 (Fig. 5C). This analysis first confirmed the highest toxicity of CCP compared to CCAM3 as previously observed with non-diluted 21 days-old filtrates (Fig. 2). This difference was evident in PB 260, due to the high sensitivity of this clone, but less marked in the tolerant cultivar RRIM 600, in good agreement with the results presented in Fig. 2. Secondly, it showed that toxicity of both filtrates increased over time (Fig. 5B and C), with a time-lag between cassiicolin gene expression (Fig. 5A) and symptoms development (Fig. 5B and C). Indeed, in the CCP mycelium grown in liquid culture, the cassiicolin gene was preferentially expressed in the younger (7 days-old) culture, while filtrate toxicity was higher after 14 or 21 days of culture (Fig. 5).

**Expression in spore-inoculated leaves (Fig. 6):** Cassiicolin gene expression was analyzed in spore-inoculated leaves from PB 260 and RRIM 600, at various time-points after inoculation (1, 2, 5 and 9 days post-inoculation), for both isolates CCP and CCAM3 comparatively. The use of a *C. cassiicola*-specific reference gene was specially important in this case (*in planta*) since the samples mixed both plant and fungal RNA, with the quantity of fungal RNA increasing over time, following the mycelium development in the leaf. Normalization with the *C. cassiicola*-specific EF1 $\alpha$  gene allowed measuring of the cassiicolin gene expression level independently of the mycelium development. In the highly susceptible cultivar PB 260 (Fig. 6A), inoculation with CCP resulted in a strong induction of the cassiicolin gene, as early as one day post-inoculation. This expression then decreased to become negligible at 5 and 9 dpi. Inoculation with the isolate CCAM3 induced a delayed and smaller peak of cassiicolin gene expression, with a



**Fig. 6.** Real-time RT-PCR analysis of the cassiicolin gene expression in spore-inoculated leaves. The susceptible cultivar PB260 (A) and the tolerant cultivar RRIM600 (B) were inoculated with either CCP or CCAM3 conidia. RNA was extracted from leaf pieces (2.5 cm<sup>2</sup>) collected at the inoculation sites, at various time-points after inoculation (1, 2, 5 and 9 days post-inoculation). Cassiicolin transcripts levels were measured using primers F12 and Cc-qCas1-R2, with the reverse primer overlapping intron 2 splicing sites. The reference gene used for normalization was a *C. cassiicola*-specific EF1 $\alpha$  gene, amplified using the primers Cc-qEF1 $\alpha$ -F1 and Cc-qEF1 $\alpha$ -R1, with the reverse primer also overlapping an intron splicing sites. The relative expression measures the inoculation-induced variation of cassiicolin gene expression at each time-point, for both CCP and CCAM3 isolates. The data are presented as means  $\pm$  standard error from two independent replicates.

maximum level at 2 dpi. In the tolerant cultivar RRIM 600 (Fig. 6B), both isolates induced a strong peak of expression at 2 dpi but with an important differential in favor of CCP compared to CCAM3. Cassiicolin gene expression was also negligible at 5 and 9 dpi in this cultivar.

The peak of cassiicolin gene expression precedes symptoms development. Indeed, at day 1 or day 2 post-inoculation (when the cassiicolin gene expression is maximum), only pinpoint necrosis were visible. Then the symptoms developed gradually, as expected, to become maximum at day 9 (data not shown), while cassiicolin gene expression decreased. This was observed for both CCP and CCAM3 isolates, whatever the cultivar.

## 4. Discussion

### 4.1. Characterization of the cassiicolin gene

We have previously shown that cassiicolin is a 27 amino acid protein secreted by *C. cassiicola* [9], presumably involved in CLF disease in rubber tree. In this work, we present the cloning and characterization of the first cassiicolin-encoding gene and demonstrate that it is functionally expressed both *in vitro* and in interaction with the plant. It appeared from its gene structure that cassiicolin typically belongs to the so called “small secreted proteins” (SSPs), which are proteins of low molecular weight, leaded by a signal peptide



and processed via the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus before secretion [18,19]. Many of these SSPs, often produced by pathogens, are rich in cysteine residues forming disulfide bonds that play a critical role in folding and consequently stability of the molecule. Despite their structural homology, cysteine-rich SSPs often have neither sequence homology nor functional relationship with each other.

The cassiicolin precursor gene shares no sequence homology with any other gene, to the exception of the subsequently registered CT1 gene (GU373809) encoding a variant form of cassiicolin. This confirms the novelty of cassiicolin among the fungal SSP effectors involved in plant/pathogens interactions.

#### 4.2. Physiological races

Spore inoculation of three isolates (CCP, CCAM3 and CCAM1) on eight different cultivars (Table 1) confirmed that for a given isolate, the level of virulence is cultivar-dependent, and that different isolates display different levels of virulence on a given cultivar, as shown previously using slightly different procedures [7].

The existence of physiological races, varying in cultivar preferences, among *C. cassiicola* isolates from rubber is now well assumed, with at least two races among Malaysian isolates [20,21]. Various pathogenic profiles were also described among Chinese *C. cassiicola* isolates but their connection to previously described races 1 and 2 was unclear since the host range used in both studies were different [22]. In our analysis (Table 1), it seems that our three isolates do not belong to race 1 since RRIM 600 is tolerant to all three of them. However, it cannot be concluded whether they belong to race 2 or an other race, unless they could be tested on the same discriminating cultivar RRIM 2020 [20]. It seems that CCP and CCAM3 belong to the same race because the ranking by susceptibility of the various cultivars in response to these two isolates was globally the same. By contrast, CCAM1 had different cultivar preferences. As an example, cultivar RRIC 100 was the least susceptible to CCAM1, while it was among the most susceptible to CCP. This suggests that CCP and CCAM3 may belong to the same physiological race and CCAM1 to another.

According to the inverse gene-for-gene interaction model applying to non biotrophic fungi [23,24], the level of virulence observed can depend on qualitative as well as quantitative variations of either the fungal effectors and/or their plant targets (copy number, affinity, accessibility, etc.).

#### 4.3. Do qualitative variations of the cassiicolin gene or protein account for virulence differences?

To investigate the hypothesis that qualitative variations of cassiicolin may affect the virulence of *C. cassiicola* in rubber tree, we attempted the purification of the toxin and the cloning of the corresponding gene from the three isolates (CCP, CCAM3 and CCAM1) shown to display different levels of aggressiveness. Purification of cassiicolin from the culture filtrate was successfully completed for the highly and moderately aggressive isolates CCP and CCAM3, consistently with the detection of the cassiicolin gene by PCR and Southern blotting in these two isolates. Cloning of the cassiicolin precursor gene from both CCP and CCAM3 revealed fully identical sequences. In addition, the molecular masses of the purified toxins, measured by mass spectrometry, were also identical. Therefore it can be concluded that the cassiicolin gene products produced by CCP and CCAM3 isolates are strictly identical, not only in their primary structure but also in their post-translational modifications (glycosylation with a methyl-mannose [8]) and consequently, that the difference in aggressiveness observed between the two isolates could not be attributed to qualitative variations in cassiicolin structure.

In the case of CCAM1, no cassiicolin gene was detected and the biochemical approach failed to isolate any toxic molecule from the culture filtrate, although this isolate was found pathogenic (with low aggressiveness) on certain cultivars (Table 1). Two hypotheses may be proposed, the first one being that CCAM1 pathogenicity may be caused by a completely different effector yet to be identified. The second hypothesis is that CCAM1 may carry a highly divergent form of cassiicolin and that the parameters used for gene detection or biochemical purification were not adapted. Our observations support the first hypothesis that CCAM1 disease effector is likely to be different from cassiicolin. Indeed, all our attempts to detect a cassiicolin-like gene by PCR failed, although different sets of primers were tested, designed from the various regions of the gene, from either the cassiicolin gene or its divergent form CT1 (GU373809). In addition, Southern blot hybridization using a probe targeting the mature cassiicolin domain also failed to detect a cassiicolin gene homologue. Biochemical purification of a toxic molecule from the filtrate could not be fulfilled, although certain fractions collected after reverse phase chromatography were found toxic. One reason for this could be that the purification process, optimized for cassiicolin, was potentially unsuitable in case of a toxic molecule differing from cassiicolin in its structure or chemical nature. However, another explanation, standing up for both hypotheses, may be that the toxic molecule was present in such a low amount in the culture filtrate that it became too diluted and undetectable over the successive purification steps.

The chemical structure of the so far characterized fungal host-selective toxins (HSTs) can be very diverse, with a majority of low molecular weight secondary metabolites but a few proteinaceous toxins [25]. The wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*, for example, produces at least three HSTs including two proteins (Ptr ToxA and Ptr ToxB) and a non proteinaceous low molecular weight molecule (Ptr ToxC) [23]. Each of the eight *P. tritici-repentis* races identified so far displays a specific toxin pattern involving either one or several of these HSTs [26]. In addition, the virulence determinism may follow different models for each toxin. For example, the *ToxA* gene is present in ToxA-producing pathogenic races but absent from non-pathogenic races. In contrast, *ToxB* relatives can be found in races of *P. tritici-repentis* that do not produce the Ptr ToxB protein and are not pathogenic to Ptr ToxB-sensitive cultivars [26–28]. Differential expression of *ToxB*, whether due to differences in gene copy number or to transcriptional regulation, may account for quantitative variations in the virulence of *P. tritici-repentis* [29].

#### 4.4. Does transcriptional regulation of the cassiicolin gene influence *C. cassiicola* aggressiveness?

CCP is globally more aggressive than CCAM3, in average on eight cultivars (Table 1). Since both isolates produce cassiicolin and assuming that their toxins are qualitatively identical (in sequence, mass, and toxicity at equivalent concentration), we investigated whether transcriptional regulation of the cassiicolin gene may account for such differences in aggressiveness between these two isolates in a given cultivar (i.e. without variability at the plant level). In this purpose, cassiicolin transcript levels were analyzed both *in vitro* and in interaction with the plant, using both isolates on two rubber tree cultivars (PB 260 and RRIM 600).

First, the fact that the cassiicolin gene was expressed *in vitro* (Fig. 5) as well as *in planta* (Fig. 6), for both CCP and CCAM3, indicated that cassiicolin gene expression does not require plant factors to be turned on. Moreover, in interaction with the plant, the gene was expressed in both the susceptible (PB 260) and the tolerant (RRIM 600) cultivars. It can therefore be concluded that the capacity of a given isolate to express the cassiicolin gene *in planta*, and potentially synthesize the toxin (in the absence of post-transcriptional

regulation), is not cultivar-dependent. Conversely, sensitivity to the toxin was shown to be cultivar-dependent, according to the bioassays using purified cassiicolin, on both PB 260 and RRIM 600 (Fig. 3). Although the plant factor(s) responsible for the sensitivity to cassiicolin have not been characterized yet, it can be hypothesized that variations in the number, affinity or functionality of the plant cassiicolin receptors may be responsible for differences in sensitivity between cultivars.

The kinetics of cassiicolin gene expression are not following the kinetics of symptoms development. This was observed *in planta* for both CCP and CCAM3 isolates, whatever the cultivar. It was also observed *in vitro* for CCP on cultivar PB 260 (Fig. 5). There are several interpretations for this time-lag. When the cassiicolin-sensitive cultivar PB 260 is infiltrated with purified cassiicolin, the necrosis is not visible until 2 days after treatment. It is therefore possible that, while cassiicolin transcripts levels reach their maximum 1 or 2 days after infection, toxin activity does not peak until 3 or 4 days post-inoculation. In addition cassiicolin is known to be very stable (owing to its very compact 3D structure) and it can therefore accumulate over time, while the cassiicolin transcripts are down-regulated. Another interpretation may be that another effector may contribute to symptoms development, in place of or in addition to cassiicolin. What so ever, the early expression of the cassiicolin gene during the first 2 days post-inoculation suggests a role of cassiicolin in the early phase of infection.

We further examined the differences in cassiicolin transcripts level between the two isolates, and their concordance with aggressiveness or filtrate toxicity. In the susceptible cultivar PB 260, CCAM3 peak of expression was lower and delayed compared CCP, which created an important differential at 1 dpi (Fig. 6A). This is coherent with CCP higher filtrate toxicity compared to CCAM3 (Figs. 2 and 5B). However it was not in such a good coherence with the results of spore inoculation since the two isolates were found statistically similar in aggressiveness (Table 1). We suspect that the method used for calculating the severity index (Fig. 2), based on five classes of symptoms, may be less accurate than the method used for evaluating filtrates toxicity (Fig. 3), based on the exact size of necrotic tissues and therefore less discriminating, especially for virulent isolates on highly susceptible cultivars. However, we cannot exclude the hypothesis that other disease effectors may contribute to CCAM3 aggressiveness in addition to cassiicolin. In the tolerant cultivar RRIM 600, CCP displayed a higher transcript level compared to CCAM3 at 2 dpi (Fig. 6B) or in the 7 days-old *in vitro* cultures (Fig. 5), in good coherence with its higher levels of virulence (Table 1) and toxicity (Figs. 2 and 5C, taking into account the statistical test on the RRIM 600 data set alone which confirmed CCP more toxic than CCAM3).

In the absence of antibodies directed against cassiicolin, it was not possible to precisely quantify toxin accumulation and correlate it with gene expression but we think that a differential in cassiicolin gene expression in the early phase of development may contribute, at least in part, to the difference in aggressiveness between these two isolates. In many ways, cassiicolin gene expression profiles remind that of *ToxB*, the gene encoding the SSP necrotic effector *Ptr ToxB* in the wheat pathogen *P. tritici-repentis* [29]. *Ptr ToxB* transcript abundance was positively correlated with the intensity of symptoms induced in a susceptible wheat cultivar, and with a more efficient development of the appressoria. *ToxB*, like the cassiicolin gene, was actively transcribed in the early phase of infection, with a peak of transcripts 1 day after inoculation in the susceptible cultivar (later in the resistant cultivar), before any visible symptom, for both a highly and a moderately aggressive isolates.

We have shown that the cassiicolin gene is functional and preferentially expressed in the early phase of infection, in both the susceptible and the tolerant cultivar, and that sensitivity/tolerance

to cassiicolin is cultivar-dependent. Transcriptional regulation of the cassiicolin gene may contribute to differences in aggressiveness between two isolates in the same cultivar, but not to the difference in pathogenicity/virulence of one isolate in different cultivars. However, the exact role of cassiicolin in *C. cassiicola* pathogenicity is still a matter of debate and the existence of other effectors contributing to the disease remains a possibility.

The cloning of the first cassiicolin precursor gene, described here, paves the way for genetic manipulations of the fungus, such as knocking down the cassiicolin gene from a virulent isolate or expressing it in a non pathogenic isolate, in order to indisputably evaluate the role of cassiicolin in *C. cassiicola* pathogenicity in rubber tree. In addition, molecular screening of cassiicolin-like genes among the population of *C. cassiicola*, should help deciphering the determinism of virulence, cultivar preferences and host specialization of this important pathogen. The use of purified cassiicolin for assaying the susceptibility of rubber trees to *C. cassiicola* is an attractive perspective in the view of selection programs. However, this work demonstrated the existence of yet unidentified disease effectors, differing from cassiicolin, in *C. cassiicola* isolates such as CCAM1. This underlines the necessity to further characterize the other *C. cassiicola* disease effectors and their role in pathogenicity before envisaging toxin-based assessment of rubber trees susceptibility. More generally, a better knowledge of cassiicolin, as a new fungal SSP effector, will contribute to our understanding of the yet ill-understood necrotrophic pathosystems.

## Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from IFC (Institut Français du Caoutchouc, Paris, France) and the companies Michelin (Clermont-Ferrand, France), SIPH ("Société Internationale de Plantations d'Hévéas", Courbevoie, France) and SOCFIN ("Société Financière des Caoutchoucs", Bruxelles, Belgium). We are grateful to Sébastien Duplessis (INRA, Nancy) who performed blast analyses of the cassiicolin gene sequence against a number of genomic databases for ascomycetes and basidiomycetes.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plantsci.2011.10.017.

## References

- [1] C.L. Schoch, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, E.W. Boehm, T.I. Burgess, J. de Gruyter, G.S. de Hoog, L.J. Dixon, M. Grube, C. Gueidan, Y. Harada, S. Hatakeyama, K. Hirayama, T. Hosoya, S.M. Huhndorf, K.D. Hyde, E.B. Jones, J. Kohlmeyer, A. Kruys, Y.M. Li, R. Lucking, H.T. Lumbsch, L. Marvanova, J.S. Mbatchou, A.H. McVay, A.N. Miller, G.K. Mugambi, L. Muggia, M.P. Nelsen, P. Nelson, C.A. Owensby, A.J. Phillips, S. Phongpaichit, S.B. Pointing, V. Pujade-Renaud, H.A. Raja, E.R. Plata, B. Robbertse, C. Ruibal, J. Sakayaroj, T. Sano, L. Selbmann, C.A. Shearer, T. Shirouzu, B. Slippers, S. Suetrong, K. Tanaka, B. Volkmann-Kohlmeyer, M.J. Wingfield, A.R. Wood, J.H. Woudenberg, H. Yonezawa, Y. Zhang, J.W. Spatafora, A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes, *Stud. Mycol.* 64 (2009) 1–15.
- [2] A. Newsam, Plant Pathology Division Report, in: Plant Pathology Division Report, Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia, 1960, pp. 63–70.
- [3] T. Ramakrishnan, P. Pillay, Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei, *Rubber Board Bull.* 5 (1961) 52–53.
- [4] L.J. Dixon, R.L. Schlub, K. Pernezny, L.E. Datnoff, Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*, *Phytopathology* 99 (2009) 1015–1027.
- [5] N.I.S. Liyanage, A.S. Liyanage, A study on the production of a toxin in *Corynespora cassiicola*, *J. Rubber Res. Inst. Sri Lanka* 65 (1986) 51–53.
- [6] A. Nugawela, N.I.S. Liyanage, A.D.S. Liyanage, R.K. Aluththawage, Influence of infection by *Corynespora cassiicola* on carbon dioxide assimilation rate in Hevea leaves, *J. Nat. Rubber Res.* 4 (1989) 233–238.
- [7] F. Breton, C. Sanier, J. d'Auzac, Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of Hevea, *J. Rubber Res.* 3 (2000) 115–128.

- [8] P. Barthe, V. Pujade-Renaud, F. Breton, D. Gargani, R. Thai, C. Roumestand, F. de Lamotte, Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*, J. Mol. Biol. 367 (2007) 89–101.
- [9] F. de Lamotte, M.P. Duviau, C. Sanier, R. Thai, J. Poncet, D. Bieysse, F. Breton, V. Pujade-Renaud, Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 849 (2007) 357–362.
- [10] T. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, Academic Press, San Diego, 1990.
- [11] F. Hallé, R. Martin, Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) Müll. Arg., (Euphorbiacées, crotonoïdées), Adansonia 8 (1968) 475–503.
- [12] S. Moser, T. Muller, A. Holzinger, C. Lutz, S. Jockusch, N.J. Turro, B. Krautler, Fluorescent chlorophyll catabolites in bananas light up blue halos of cell death, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009) 15538–15543.
- [13] A.M. Risterucci, L. Grivet, J.A.K. N'Goran, I. Pieretti, M.-H. Flament, C. Lanaud, A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L., Theor. Appl. Genet. 101 (2000) 948–955.
- [14] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 3389–3402.
- [15] J.D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, S. Brunak, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, J. Mol. Biol. 340 (2004) 783–795.
- [16] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29 (2001) e45.
- [17] R\_Development\_Core\_Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009.
- [18] M. Rep, Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization, FEMS Microbiol. Lett. 253 (2005) 19–27.
- [19] J. Choi, J. Park, D. Kim, K. Jung, S. Kang, Y.H. Lee, Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes, BMC Genom. 11 (2010) 105.
- [20] H. Ismail, I. Jeyanayagi, Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of Hevea, in: Q.B. Chen, J.N. Zhou (Eds.), IRRDB Symposium, Haikou, China, 1999.
- [21] N.A. Nghia, J. Kadir, E. Sunderasan, M. Puad Abdullah, A. Malik, S. Napis, Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia, Mycopathologia 166 (2008) 189–201.
- [22] Y. Qi, Y. Xie, X. Zhang, J. Pu, H. Zhang, S. Huang, H. Zhang, Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*, Mol. Biotechnol. 41 (2009) 145–151.
- [23] L.M. Ciuffetti, V.A. Manning, I. Pandelova, M.F. Betts, J.P. Martinez, Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction, New Phytol. 187 (2010) 911–919.
- [24] S. Deller, K.E. Hammond-Kosack, J.J. Rudd, The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves, J. Plant Physiol. 168 (2011) 63–71.
- [25] T.J. Wolpert, L.D. Dunkle, L.M. Ciuffetti, Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? Annu. Rev. Phytopathol. 40 (2002) 251–285.
- [26] R.M. Andrie, I. Pandelova, L.M. Ciuffetti, A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification, Phytopathology 97 (2007) 694–701.
- [27] J.P. Martinez, N.W. Oesch, L.M. Ciuffetti, Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, ToxB, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, Mol. Plant Microbe Interact. 17 (2004) 467–474.
- [28] S.E. Strelkov, R.F. Kowatsch, G.M. Ballance, L. Lamari, Characterization of the ToxB gene from North African and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, Physiol. Mol. Plant Pathol. 67 (2006) 164–170.
- [29] S. Amaike, J.A. Ozga, U. Basu, S.E. Strelkov, Quantification of ToxB gene expression and formation of appressoria by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* differing in pathogenicity, Plant Pathol. 57 (2008) 623–633.

## Supplementary information Si.1

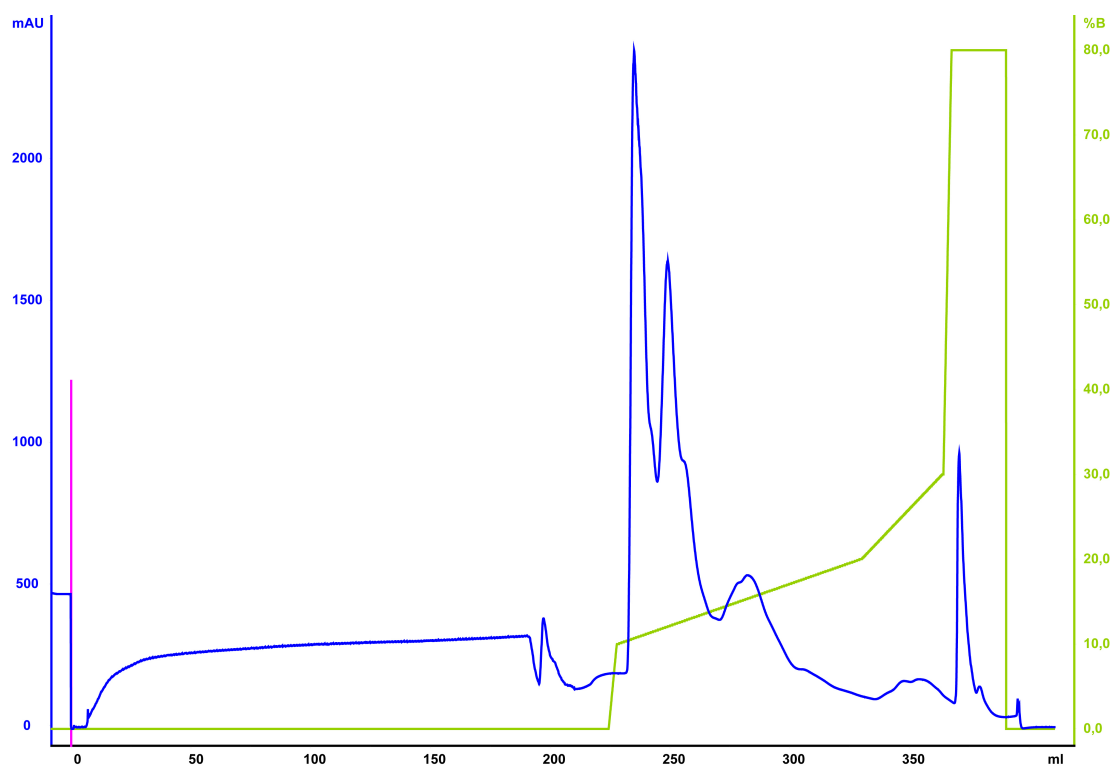
Primer name	Sequence (5'- 3')
CasF1	acntgygtntcntgygt
CasF6	acntgygtnagytygyt
CasR1	rcanccngarcangccca
CasR6	rcanccrctrcangccc
CasSP1-F	atttcggcaatgggtttgt
CasSP2-F	ggcgataactgtgtaattcttg
CasSP1-R	acaaaacccattgccgaaat
CasSP2-R	caagaattaccacagttatcgcc
CasF9	atcaattccaaatcttgaaaatctgtcc
CasF12	gtaagctgtgtcaatttcggc
CasR16	ggatccgtaagagtataaatttgtgtatg
CasR19	ccaaagttaacatcccgaaca
Oligo-dT-VN	t <sub>(25)</sub> vn
SMART II A *	aagcagtgggtatcaacgcagagtagcgagg
3' SMART CDS primer II A *	aagcagtgggtatcaacgcagagtact <sub>(30)</sub> vn
5' PCR primer II A *	aagcagtgggtatcaacgcagagt
CcAct-F	caggaaggacctgtacggcaaca
CcAct-R	tggggcaagagcagtgatctc
Cc-qITS-F1	ggaccaccacaaaaccatt
Cc-qITS-R1	gcggaggcgggacagacg
ITS1	tccgtaggtgaacctgcgg
ITS4	tcctccgcttattgatatgc
Cc-qCas1-R2	ggtaattcttgggcttgttcgggatg
Cc-qEF1□-F1	caccgtcattgacgcccc
Cc-qEF1□-R1	gcctcgaactcaccagtacc

“n” = a, t, c or g; “y” = c or t; “r” = a or g; “v” = a, g or c.

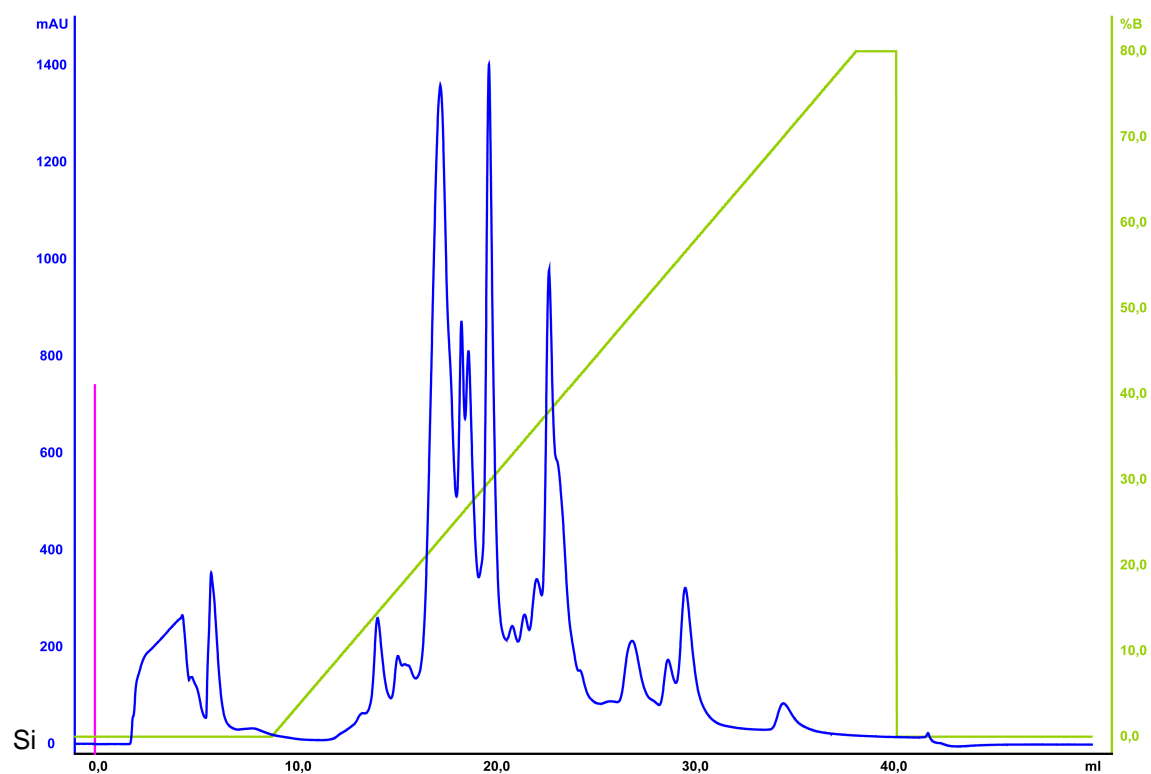
\* from the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech)

## Supplementary information Si.2

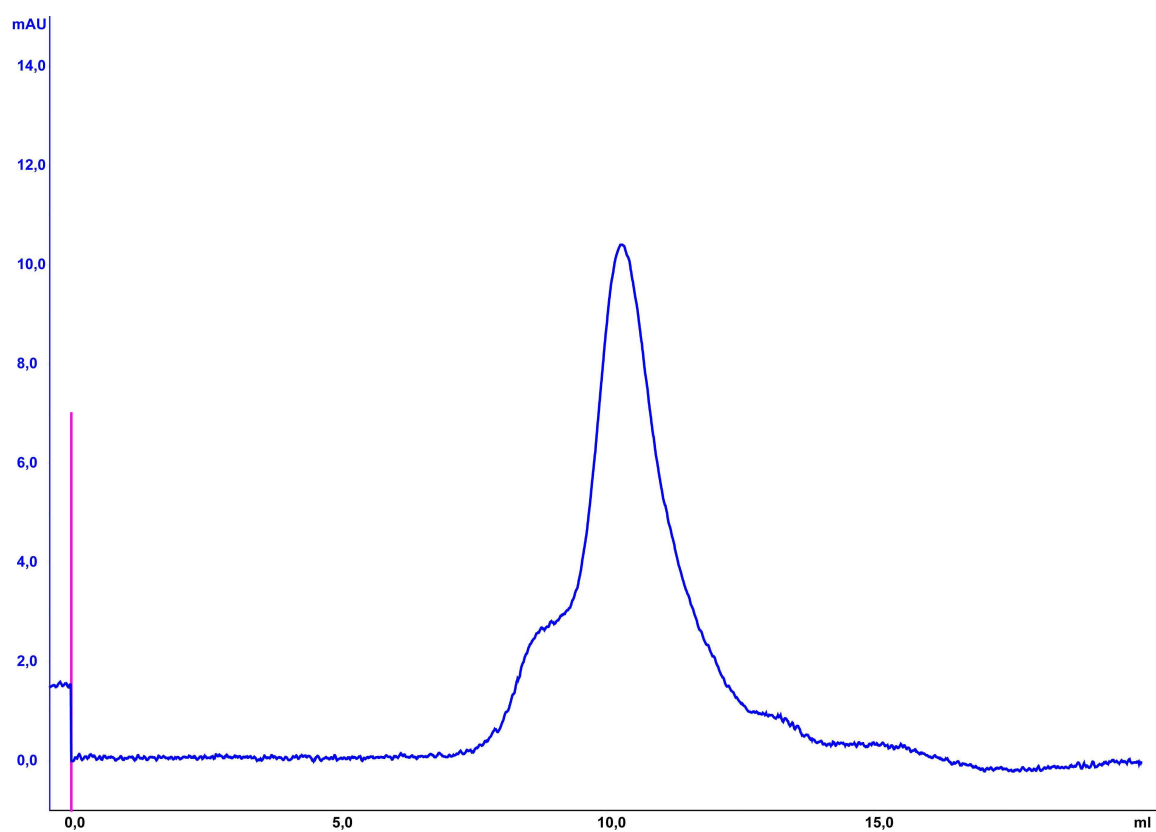
Si-2 A. Source15 RPC, CCP



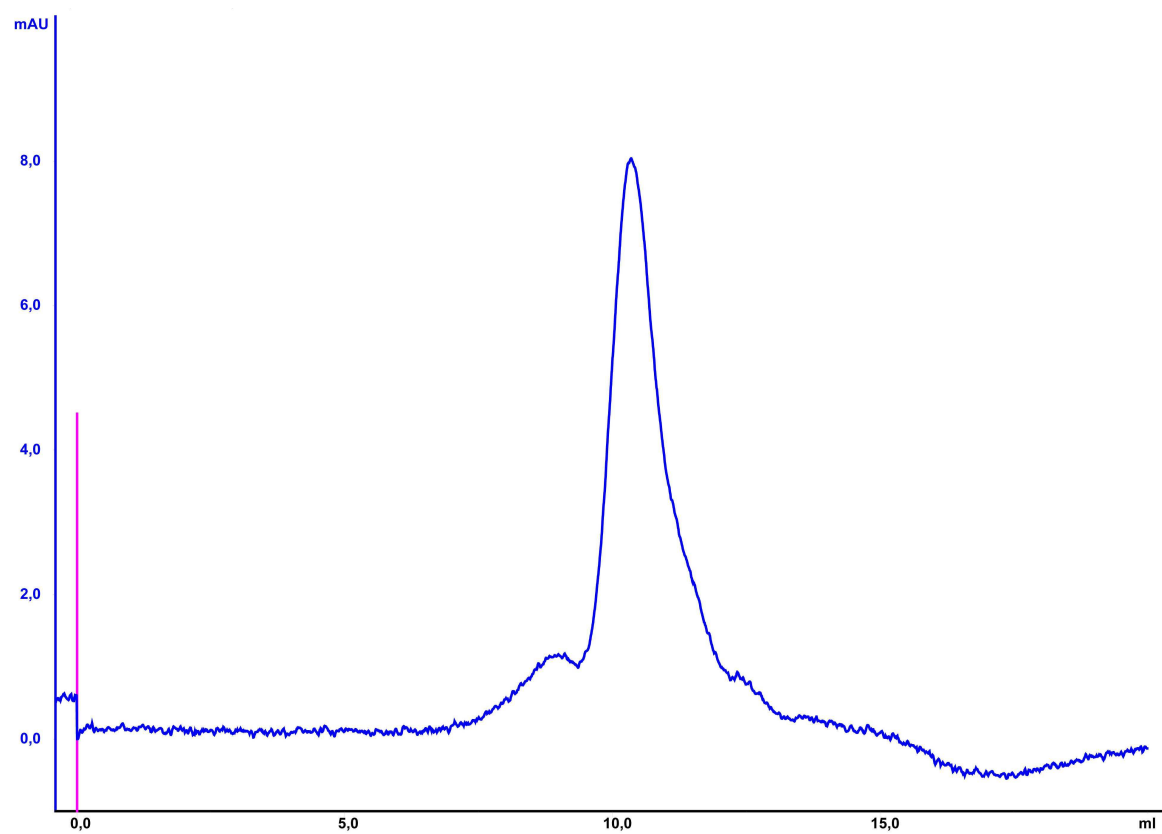
Si-2B. Source15 RPC, CCAM3







Si-D. Superdex 30 Prep-Grade, CCAM3



## *CHAPITRE 2*

**First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil**

Publié dans Fungal Diversity (2012) 54: 87-99



*First characterization of endophytic  
Corynespora cassicola isolates with  
variant cassicolin genes recovered from  
rubber trees in Brazil*

**Marine Déon, Ana Scomparin, Aude  
Tixier, Carlos R. R. Mattos, Thierry  
Leroy, Marc Seguin, Patricia Roeckel-  
Drevet & Valérie Pujade-Renaud**

**Fungal Diversity**

An International Journal of Mycology

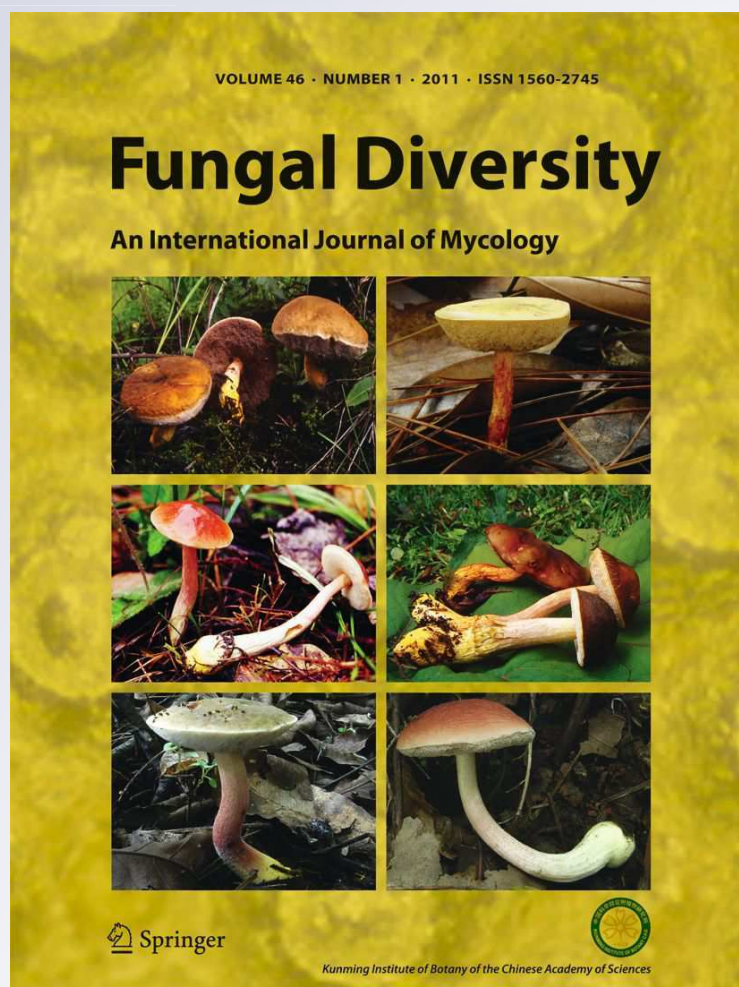
ISSN 1560-2745

Volume 54

Number 1

Fungal Diversity (2012) 54:87-99

DOI 10.1007/s13225-012-0169-6



**Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.**

# First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil

Marine Déon · Ana Scomparin · Aude Tixier ·  
Carlos R. R. Mattos · Thierry Leroy · Marc Seguin ·  
Patricia Roeckel-Drevet · Valérie Pujade-Renaud

Received: 28 December 2011 / Accepted: 30 March 2012 / Published online: 27 April 2012  
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** *Corynespora cassiicola* is the causal agent of Corynespora Leaf Fall (CLF) disease. CLF is one of the most important fungal diseases of rubber trees in Asia and Africa but disease outbreaks have not been reported in South America. Cassiicolin, a small cysteine-rich glycoprotein secreted by the pathogenic *C. cassiicola* isolate CCP, was previously identified as a potential disease effector in rubber tree. Recently, the cassiicolin-encoding gene (*Cas1*) was characterized and shown to be expressed in the early phase of infection. In this study, we investigated whether previously undetected strains of *C. cassiicola* are present in South American rubber plantations by examining the fungal endophyte population found in asymptomatic rubber tree leaves. Four isolates were identified as *C. cassiicola*. Genes encoding new forms of the cassiicolin precursor protein (Cas3 and Cas4) were identified from these isolates.

Three of four isolates were able to induce symptoms on the cultivar they were isolated from in a detached leaf assay, with different kinetics and intensities. One isolate had the same pathogenicity profile as the pathogenic isolate CCP; the other two isolates developed symptoms late during the course of infection, suggesting saprotrophic capabilities. However, no *Cas3* or *Cas4* transcripts could be detected upon inoculation with the endophytic isolates, whereas the reference gene *Cas1* was expressed upon inoculation with the CCP isolate. This work demonstrated that *C. cassiicola* is present in South America in an endophytic form and that it may evolve from an endophytic to a saprophytic or even potentially pathogenic life style.

**Keywords** *Corynespora cassiicola* · Rubber tree · Endophyte · Brazil · Cassiicolin

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s13225-012-0169-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Déon · V. Pujade-Renaud (✉)  
CIRAD, UMR AGAP,  
63000 Clermont-Ferrand, France  
e-mail: valerie.pujade-renaud@cirad.fr

M. Déon · A. Scomparin · A. Tixier · P. Roeckel-Drevet  
Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF,  
63000 Clermont-Ferrand, France

C. R. R. Mattos  
Plantações Michelin de Bahia,  
Box 02, 45435-000 Ituberá, Bahia, Brazil

T. Leroy · M. Seguin  
CIRAD, UMR AGAP,  
34398 Montpellier, France

## Introduction

*Corynespora cassiicola* (Berk & M. A. Curtis) C.T. Wei is an anamorphic *Ascomycota* fungus belonging to the *Dothideomycetes* and forming a separate phylogenetic clade among the *Pleosporaceae* with *Corynespora smithii* (Schoch et al. 2009). It has been found on leaves, stems, fruits and roots of more than 300 plant species primarily in tropical and subtropical areas (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>; Farr and Rossman 2011). Principally described as a pathogen, it causes severe damage to economically important plants, including rubber tree, tomato, cucumber, cotton and soybean (Chee 1990; Koenning et al. 2006; Oliveira et al. 2006, 2007; Schlub et al. 2009). However, *C. cassiicola* isolates were also obtained from dead organic material (Kingsland 1985; Lee et al. 2004; Cai et al. 2006) and



asymptomatic tissues (Collado et al. 1999; Suryanarayanan et al. 2002; Gond et al. 2007; Promputtha et al. 2007), and were therefore designated as saprophytes and endophytes, respectively.

In the rubber tree, *C. cassiicola* has thus far been exclusively known as a necrotrophic pathogen that causes the Corynespora Leaf Fall (CLF) disease, which ranks among the most important fungal diseases in Asian and African rubber plantations. Initially, *C. cassiicola* was described as a minor pathogen capable of attacking only budwood or seedling nursery plants (Newsam 1960; Chee 1988), but in 1975, the first epidemic outbreak on a plantation scale occurred in Indonesia. In the 1980s, several other countries in Southeast Asia were severely affected by disease outbreaks and thousands of hectares of rubber trees were uprooted in Malaysia, Indonesia, Thailand and Sri Lanka (Liyanage et al. 1986; Pongthep 1987; Chee 1988). By the end of the 1980s, African countries were also affected by CLF. The disease severity further increased until several important rubber tree cultivars considered to be tolerant or resistant to CLF during the first epidemic in the mid 1980s succumbed to the disease (Jayasinghe and Silva 1996; Shamsul and Shamsuri 1996; Sinulingga et al. 1996; Wahounou et al. 1996). Currently, all Asian and African rubber-producing countries, which account for 98 % of the natural rubber production in the world (94 and 4 % for each continent, respectively), are affected by the disease resulting in considerable economic losses.

CLF is characterized by necrotic lesions that develop on both young and mature leaves and lead to extensive defoliation. The fungus typically causes areas of necrosis with a fish bone appearance due to the darkening of the veins adjacent to the lesions (Chee 1988; Liyanage and Liyanage 1986; Pongthep 1987). However, the symptoms vary depending on the age, type and location of the rubber tree (Jayasinghe et al. 1998). This symptom variability impedes diagnosis of the disease in a plantation. Additionally, *C. cassiicola* isolates within the same agroclimatic zone vary widely in morphology, colony color, growth, spore production, pathogenicity and genetic diversity (Darmono et al. 1996; Jayasinghe and Silva 1996; Breton et al. 2000; Atan and Hamid 2003; Romruensukharom et al. 2005; Dixon et al. 2009; Qi et al. 2009).

Colonization of the rubber tree tissues by *C. cassiicola* involves the secretion of phytotoxic molecules (Onesiroso et al. 1975; Liyanage and Liyanage 1986; Purwantara 1987; Nugawela et al. 1989; Breton et al. 2000). A toxin called cassicolin was purified and characterized from the culture filtrate of a rubber tree isolate (CCP) from the Philippines (Breton et al. 2000; Barthe et al. 2007; de Lamotte et al. 2007). The toxin is a small, secreted glycosylated protein that plays an important role in *C. cassiicola* pathogenicity. The cassicolin-encoding gene encodes a precursor protein

containing a signal peptide at the amino terminus that is predicted to target the protein for secretion (Déon et al. 2012). This gene is expressed one or two days post-inoculation, suggesting a role in the early phase of infection.

Only a single report mentions CLF symptoms on *Hevea brasiliensis* growing in the American continent (Junqueira et al. 1985). In this area, *C. cassiicola* remains benign on rubber trees but causes significant damage to many other plant species. Could outbreaks of CLF disease occur in South American rubber plantations? To answer this question, we investigated whether previously undetected strains of the pathogen were present in rubber plantations in this area. The purpose of our study was to test for the presence of *C. cassiicola* among fungal rubber tree endophytes from a plantation in Brazil that had no history of the disease and to characterize these isolates.

## Material and methods

### Plant material

Fungal endophytes were recovered from young *Hevea brasiliensis* trees in nurseries consisting of 10 different cultivars (CDC 312, CDC 1174, FDR 5240, FDR 5665, FDR 5788, GT 1, MDF 180, PB 260, PMB 1 and RRIM 600) from a rubber tree plantation in Bahia, Brazil. The plants used for the inoculation and gene expression experiments (cultivars RRIM 600 and FDR 5788) were cultivated in a greenhouse in Clermont-Ferrand (France) at 28 °C±2 °C with 80 % relative humidity. All of the cultivars were grafted clones.

### Isolation of endophytic fungi from asymptomatic Brazilian rubber tree leaves

Fungal endophytes were isolated from asymptomatic mature leaves that were collected in the nurseries and kept at room temperature for 8 days. Leaf segments were surface-sterilized through sequential immersion in 70 % ethanol (1 min), 2 % sodium hypochlorite solution (2 min), 70 % (v/v) ethanol (30 s) and sterile water. Leaf pieces with freshly cut edges were plated on Malt Extract Agar (MEA) supplemented with 0.02 % chloramphenicol and placed at 25 °C in the dark. The emergent fungi were isolated by successive subcultures.

### Molecular identification of endophytic fungi

All fungal isolates were grown from single conidia and verified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA. For DNA extraction the isolates were grown on Potato Dextrose Agar (PDA) for 13 days in the dark. The mycelia was collected, frozen in

liquid nitrogen and lyophilised. The genomic DNA was extracted as described previously (Risterucci et al. 2000). The ITS1, 5.8S, and ITS2 regions of the ribosomal DNA were amplified by PCR from 100 ng of genomic DNA in a 50 µl reaction mix containing 0.2 µM of the ITS1 and ITS4 primers (White et al. 1990), 200 µM of the dNTP mix, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1× buffer and 1 U of Taq DNA polymerase (Qbiogen, Illkirch, France). The PCR was conducted for 30 cycles under the following conditions: 45 s at 94 °C, 45 s at 55 °C and 45 s at 72 °C. The PCR products were sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany). Percentages of sequence similarity and coverage were determined by comparative similarity analyses with available sequences in the NCBI database using the Blastn program. Detailed results are given as Electronic Supplementary Material (ESM 1).

#### Detached-leaf assay

The *C. cassiicola* isolates were cultivated on PDA at 25 °C with a 12 h photoperiod. The conidia were collected and resuspended in sterile water supplemented with 0.02 % Tween20 at a concentration of 5000 conidia/ml. For each isolate, six leaves were inoculated, each with ten drops of 20 µl conidia suspension applied to the abaxial surface of detached rubber tree leaflets in developmental stage C (brownish to limp green) (Hallé and Martin 1968). One additional drop of 20 µl of sterile water supplemented with 0.02 % Tween20 was added to each leaflet as negative control. The leaflets were maintained in a moist environment at 25 °C for 24 h in the dark and then under alternate light with a 12 h photoperiod. The conidial suspension was evaporated four days after the inoculation. The lesion area per leaflet was measured manually, at 5 and 9 dpi. The entire experiment was conducted three times. The symptoms intensity (SI) was expressed as the mean lesion area ± the standard error from the 18 inoculated leaves (six leaflets per inoculation and three biological replicates).

#### Detection of cassiicolin gene homologues

Detection of cassiicolin gene homologues by PCR was conducted on the four *C. cassiicola* isolates (E70, E78, E79 and E139) from asymptomatic mature rubber tree leaves. The first set of primers was designed from the *Cas* sequence from isolate CCP (EF667973) and included CasF9, CasF11, CasF12, CasR16, CasR20 and CasR19. The second set of primers, CT1F9, CasF14, CT1R16 and CasR22, was designed from the CT1 sequence from the isolate CC004 (GU373809). Primer sequences are listed in the Electronic Supplementary Material ESM 2. PCR was performed on 100 ng of *C. cassiicola* genomic DNA for 30 cycles (45 s at 94 °C, 45 s at 50 °C, 45 s at 72 °C) using the same PCR components described above.

#### Cloning of full-length Cassiicolin gene homologues

The full-length sequence of the cassiicolin gene homologue *Cas3* was obtained by genome walking (Sallaud et al. 2003). This method allows for amplification of the 5' and 3' flanking regions of a target gene. Genomic DNA from isolate E70 was digested with 30 units of a restriction enzyme generating 3' blunt overhangs. Four restriction enzymes were tested independently: EcoRV, DraI, PvuII and StuI (New England Biolabs). The digested products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and ligated to the ADPR1/ADPR2 adaptor by T4 DNA ligase at 16 °C overnight in a final volume of 20 µl. The first PCR was performed with 1 µl of the ligation/digestion using the primer AP1, which is specific to the ADPR1 adaptor, and a primer specific to the *Cas3* partial sequence obtained previously from isolate E70 using the CasF9/CasR20 primer pair. The second PCR was performed with 2 µl of a 1/50 dilution of the PCR1 product using the nested primer AP2 (specific to the ADPR2 adaptor) and a *Cas3*-specific nested primer. To obtain the 5' flanking region, the primers AP1/CasR20 and AP2/CasW-E70-R04 were used for PCR1 and PCR2, respectively. To obtain the 3' flanking region, the primers AP1/CasF9 and AP2/CasW-E70-F04 were used for PCR1 and PCR2, respectively. PCR reactions were performed in 1× buffer containing 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of dNTPs, 200 nM of the adaptor, 0.2 µM of the *Cas*-specific primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Eurobio, Courtaboeuf, France). All PCRs were conducted under the following conditions: an initial denaturation step (4 min at 95 °C), then 40 cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, 2 min at 72 °C) and a final extension step (72 °C for 5 min). PCR products migrating as a single unique band after electrophoresis on an agarose gel were directly sequenced using nested *Cas3*-specific primers: CasW-E70-R01 for the 5' flanking region and CasW-E70-F05 for the 3' flanking region. A new set of primers (CasF20 and CasR28) was designed from both ends of the 5' and 3' flanking sequences and used to amplify the complete *Cas3* or *Cas4* sequence from isolates E70, E78, E79 and E139 using the AccuPrime™ Pfx proofreading DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's recommendations. All of the primers used in this study are listed in the Electronic Supplementary Material ESM 2.

#### Bioinformatics

All nucleotide and amino acid sequence analyses, alignments and annotations were conducted using the Geneious Pro program (Drummond et al. 2011). Homology searches were performed using the Blast program in the NCBI



database. A phylogenetic tree of the cassiicolin gene diversity was constructed using MEGA5 software (Tamura et al. 2007) by the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The analysis involved six nucleotide sequences: JF915169, JF915170, JF915171, JF915172, GU373809 and EF667973, for isolates E70, E78, E79, E139, CCP and CCP respectively. The codon positions included in the analysis were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 574 positions in the final dataset. A bootstrap test of 1000 replicates was performed to obtain the percentage in which the associated taxa clustered together (Felsenstein 1985). The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar 2000), and the results were expressed as the number of base differences per site.

The synonymous ( $d_s$ ) and non-synonymous ( $d_N$ ) substitution rates were calculated by codeml in the PAML package (Goldman and Yang 1994).

The prediction of the signal peptide in the protein was performed using SignalP software, version 3.0 (Bendtsen et al. 2004), and the program TMHMM, version 2.0, was used to check for the presence of transmembrane spanning regions in the protein (Krogh et al. 2001). The ProtComp program (version 9.0; <http://www.softberry.com>) was used to predict the subcellular localization of the protein.

#### Gene expression analyses by real-time PCR

**RNA extraction and cDNA synthesis** Leaf disks (1.77 cm<sup>2</sup>) were collected from the inoculated leaflets described above at each inoculation spot immediately after inoculation and then one, two, five and nine days post-inoculation. The controls were fragments from leaves inoculated with water supplemented with 0.02 % Tween20. For each time point, three sets of inoculated fragments were analyzed independently (three biological replicates). Collected samples were lyophilized and stored at −20 °C. The total RNA was extracted from the samples using CTAB extraction buffer (Chang et al. 1993), treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega), quantified by spectrophotometry and quality tested by electrophoresis on 1.2 % agarose gels. The first-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using oligodT and SuperScript III (Invitrogen) according to the supplier's protocol.

**Design of *Cas*-specific primers** Several pairs of primers were designed from the sequence of each *Cas* gene homologue, including at least one primer that overlapped an intron site. Their efficiency was tested on diluted cDNA pools of all time points for each isolate by cultivar set. The specificity of the amplification was analyzed using the melting temperature curves at the end of each run. The best

primer pairs were selected for the real-time RT-PCR experiments. The primers selected to amplify the *Cas1* transcripts were CasF12 and Cc-qCas1-R2. For *Cas3* and *Cas4* transcripts, the primers selected were Cc-qCas3,4-F1 and Cc-qCas3,4-R1. A third primer pair (Cc-qCas1,3,4-F1/Cc-qCas1,3,4-R1) designed to amplify conserved regions of all *Cas* homologue cDNA sequences was used as a positive control. All of these primer pairs failed to amplify any product from cDNA derived from non-inoculated leaves. Primer sequences are listed in the Electronic Supplementary Material (ESM 2).

**Design of *C. cassiicola*-specific reference gene primers** Primers were designed based on conserved regions (framing one intron site) determined from the alignment of *EF1α* or *actin* gene sequences from various fungal species, most of which belonged to the order Pleosporales, like *C. cassiicola*. Primers designed from the *EF1α* sequences were Nc-EF1α-F2 and Cc-EF1α-R1. Primers designed from the actin sequences were Cc-Actin-F4 and Cc-Actin-R1. These primers were used to amplify partial genomic sequences from all of the *C. cassiicola* isolates from this study. The PCR products were sequenced as described above and compared by multiple sequence alignment. New primers were designed for real-time RT-PCR, with the forward primer overlapping the intron. For *EF1α*, two forward primers were designed depending on the isolate due to a one-nucleotide substitution in the primer binding site. Primer Cc-qEF1α-F1 was developed for isolates CCP, E78, and E70 and primer Cc-qEF1α-F3 was developed for isolates E79 and E139. The reverse primer, Cc-qEF1α-R1, was the same for all isolates. For the actin gene, the primers designed were Cc-qActin-F2 and Cc-qActin-R2. The actin gene was used as a reference to validate the stability of the *EF1α* gene expression over the course of the infection (data not shown). The *EF1α* gene was used as a reference for the quantification of *Cas* gene expression. Primer sequences are listed in the Electronic Supplementary Material (ESM 2).

**Quantification of the cassiicolin homolog transcripts by real-time RT-PCR** Amplifications were performed using an iCycler IQ (Bio-Rad) with SYBR green as the fluorescent dye. The PCR reaction mix (25 µl) contained cDNA (2 µl of a 1/50 dilution of the first strand cDNA), 1× Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay W/ fluorescein (Eurogentec, Angers, France) and 200 nM of each primer. Polymerase chain reactions were performed as follows: 3 min at 95 °C for denaturation and amplification for 40 cycles (10 s at 95 °C, 15 s at 62 °C, 15 s at 72 °C). The relative quantitative abundance (Qr) of the *Cas* homologue transcripts was calculated by comparison with the expression of *EF1α* using the following formula

(Pfaffl 2001), with E representing the primers' efficiency, "target" referring to the cassiicolin homologues and "ref" to *EF1 $\alpha$* :

$$Qr = \frac{(1 + E_{target})^{\Delta Ct_{target}}}{(1 + E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}}}$$

The real-time PCR amplifications were performed in triplicate (technical replicates) and the experiment was repeated three times (biological replicates). Data presented are the mean  $\pm$  the standard error of the three independent biological replicates.

**Monitoring of *C. cassiicola* development in lesions by real-time RT-PCR** To analyze the development of the fungus in the plant tissues, the accumulation of transcripts of the *C. cassiicola*-specific *EF1 $\alpha$*  gene was monitored and compared to the expression of a *polyubiquitin* gene from the rubber tree (*Hb-polyubiquitin*, unpublished results). The primers used to amplify *Hb-polyubiquitin* transcripts were Hb-Ubi-F/Hb-Ubi-R (ESM 2). The composition of the real-time PCR mix and the program used for real-time PCR were the same as described above for the *Cas* homologues expression analysis, except for the annealing temperature (57 °C). The level of rubber tree colonization by *C. cassiicola* was represented by the relative expression (Qr) of the fungal *EF1 $\alpha$*  gene normalized to the rubber tree *Polyubiquitin* transcript level.

#### Statistical analyses

Analyses of variance (ANOVA) were performed with software R, version 2.10.1 (R\_Development\_Core\_Team 2009) and differences between means were tested using Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test ( $P < 0.05$ ). For real-time PCR, statistical analyses were performed on log-transformed data because empirical errors in Qr increased with Qr values consistent with the above exponential formulation.

## Results

#### Diversity of the fungal endophytes

A total of 70 endophytic fungi were isolated from asymptomatic rubber tree leaves from a rubber plantation in Bahia, Brazil (ESM 1). The molecular identification based on ITS sequence similarity revealed that 100 % of the isolates were filamentous Ascomycota. Five genera predominated of which, 49 % of the isolates belonged to the genus *Colletotrichum* and its teleomorph *Glomerella*, 15 % to the genus *Phomopsis* genus and its teleomorph *Diaporthe*, 13 %

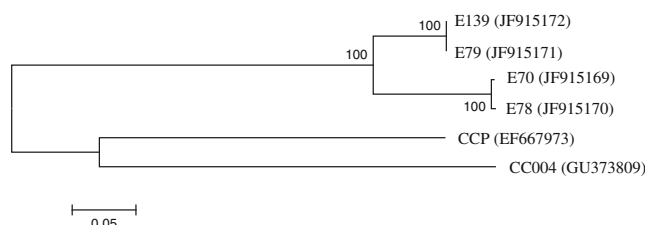
to the genus *Nigrospora*, 7 % to the genus *Xylaria* and 6 % to the genus *Corynespora*. Other rare genera were also isolated, such as *Guignardia* (two strains) and *Alternaria*, *Daldinia*, *Leptosphaerulina* and *Hypoxyton* (one strain each).

The four *Corynespora* isolates were identified as *cassiicola* species, with at least 99.8 % identity and 100 % query coverage. *C. cassiicola* isolates E78, E79 and E139 were recovered from rubber tree cultivar RRIM 600 and isolate E70 was recovered from FDR 5788. This is the first report of an endophytic *C. cassiicola* in a rubber tree in Brazil. This is of significance as CLF disease outbreaks have not been reported in rubber tree plantations in South America, although *C. cassiicola* affects many other plant species in the area.

#### Description of new cassiicolin genes from *C. cassiicola* endophytic strains

The presence of *Cas* gene homologues in all four *C. cassiicola* endophytic strains was determined by PCR using different primer pairs designed from *Cas* (EF667973), the reference cassiicolin gene cloned from the rubber tree pathogenic isolate CCP originating from the Philippines (Déon et al. 2012), and CT1 (GU373809), a *Cas* gene homologue from a Chinese rubber tree isolate (CC004). Partial sequences were successfully amplified. The full-length sequence of the *Cas* gene homologues was obtained from all four isolates using the genome walking method. The new sequences were registered under the accession numbers JF915169, JF915170, JF915171 and JF915172 for isolates E70, E78, E79 and E139, respectively.

The nucleotide sequence alignment (ESM 3 and Fig. 1) revealed some diversity among the *Cas* gene homologues from the four endophytic strains, although they are closely related sequences. E79 and E139 *Cas* gene sequences were 100 % identical, while E70 and E78 *Cas* gene sequences shared 99 % identity with each other and 99 and 98 % identity, respectively, with the E79/E139 *Cas* gene sequence. Isolates E70, E78 and E79/E139 shared 78 %, 78 % and 79 % identity, respectively, with the reference



**Fig. 1** Neighbor-joining phylogenetic tree of the cassiicolin precursor genes from four endophytic (E70, E78, E79 and E139) and two pathogenic strains of *C. cassiicola* (CCP and CC004). Bootstrap values are shown above the branch

*Cas* gene and 78 % identity with CT1. An alignment of the predicted amino acid sequences from all the *Cas* gene sequences revealed two new cassiicolin precursor proteins (Fig. 2). They were named Cas3 (protein id AFH88923 and AFH88924 from isolates E70 and E78 respectively) and Cas4 (protein id AFH88925 and AFH88926 from isolates E79 and E139 respectively), with Cas1 as the reference isoform (isolate CCP) and Cas2 as the protein encoded by CT1. Like Cas1, Cas3 and Cas4 are organized into an N-terminal domain including a 17 amino acid putative signal peptide followed by a 14 amino acid linker region and a 27 amino acid C-terminal domain corresponding to the putative mature protein. No transmembrane-spanning region was identified using the TMHMM program. An extracellular localization was predicted by Neural nets using the ProComp program, suggesting that the encoded protein may be secreted. Cas3 and Cas4 share 98 % identity (100 % positive amino acids) with each other, with only one substitution at position 15 in the signal peptide. They share respectively 93 % and 94 % identity (98 % positive amino acids) with the reference Cas1 sequence. The predicted mature cassiicolin domain shows one positive substitution (S instead of T) compared to the reference Cas1 sequence. Cas2 remains the most divergent protein isoform with seven substitutions and one insertion relative to Cas1, as described previously (Déon et al. 2012).

The 5' and 3' untranslated regions as well as the introns were the more divergent regions in the *cas* gene sequences. The ratio between the non-synonymous ( $d_N$ ) and synonymous ( $d_S$ ) substitution rates was calculated for each sequence pair to estimate the selection pressure acting on the *cas* gene. This ratio could not be calculated among the *C. cassiicola* endophytes since a single divergent nucleotide only was observed in their coding region. The  $d_N/d_S$  ratios calculated between the *cas* gene sequences from the isolates CCP, CC004 and the endophytes were all <1 (between 0.13 and 0.34) suggesting that the *Cas* gene may be under purifying selection pressure.

#### Pathogenicity of the *C. cassiicola* endophytes

Inoculations on detached leaves were performed to investigate the potential pathogenicity of the four *C. cassiicola* endophytic isolates on the cultivars from which they were

originally isolated (Fig. 3). The pathogenic strain CCP was used as a control on both cultivars. The water controls remained negative over the whole experiment. No necrosis was observed at 1 and 2 days post-inoculation (dpi) regardless of the isolate. At 5 dpi, only pinpoint necroses were visible on the leaves inoculated with the endophytic strains E78, E79 and E139 isolated from the RRIM600 cultivar. However, plants inoculated with the pathogenic isolate CCP had already developed disease symptoms at this time as lesion size had reached 445 mm<sup>2</sup>. At 9 dpi, differences between isolates were evident and the pathogenic strain CCP was the most aggressive, followed by the endophytes E139 and E79. E78 remained under the virulence threshold (pinpoint necroses only). There was no significant difference in lesion size ( $P < 0.05$ ) between the endophytic isolate E70 and the pathogenic isolate CCP on cultivar FDR 5788, with significant symptoms present at 5 dpi, which dramatically increased by 9 dpi.

#### Kinetics of mycelium development in the leaf tissues post-inoculation

The amount of mycelium that colonized rubber tree leaf tissue, post-inoculation was quantified by real-time PCR by calculating the relative expression (Qr) of a *C. cassiicola*-specific *EF1a* gene normalized to a rubber tree-specific *polyubiquitin* gene 1, 2, 5 and 9 dpi (Fig. 4). In the RRIM 600 cultivar (Fig. 4a), *EF1a* relative expression (Qr) was already detectable 1 and 2 dpi for E139 and CCP, while it was very low (nearly undetectable) for the other strains, suggesting that colonization of mycelia for these two strains started earlier, which is in agreement with their higher aggressiveness compared to E78 and E79. The Qr increased and reached a maximal level at 9 dpi, which was similar for both E139 and CCP. The development of E79 mycelium started later (between 2 dpi and 5 dpi) but finally reached levels similar to those of E139 and CCP at 5 and 9 dpi. In contrast, E78 mycelium colonization remained very low even at 9 dpi. In the FDR 5788 cultivar (Fig. 4b), the mycelium growth of both CCP and E70 was detectable as early as 1 dpi and strongly increased over time. Both strains presented similar profiles at 2, 5 and 9 dpi, although the mycelial growth may have started earlier for E70 than CCP.

```

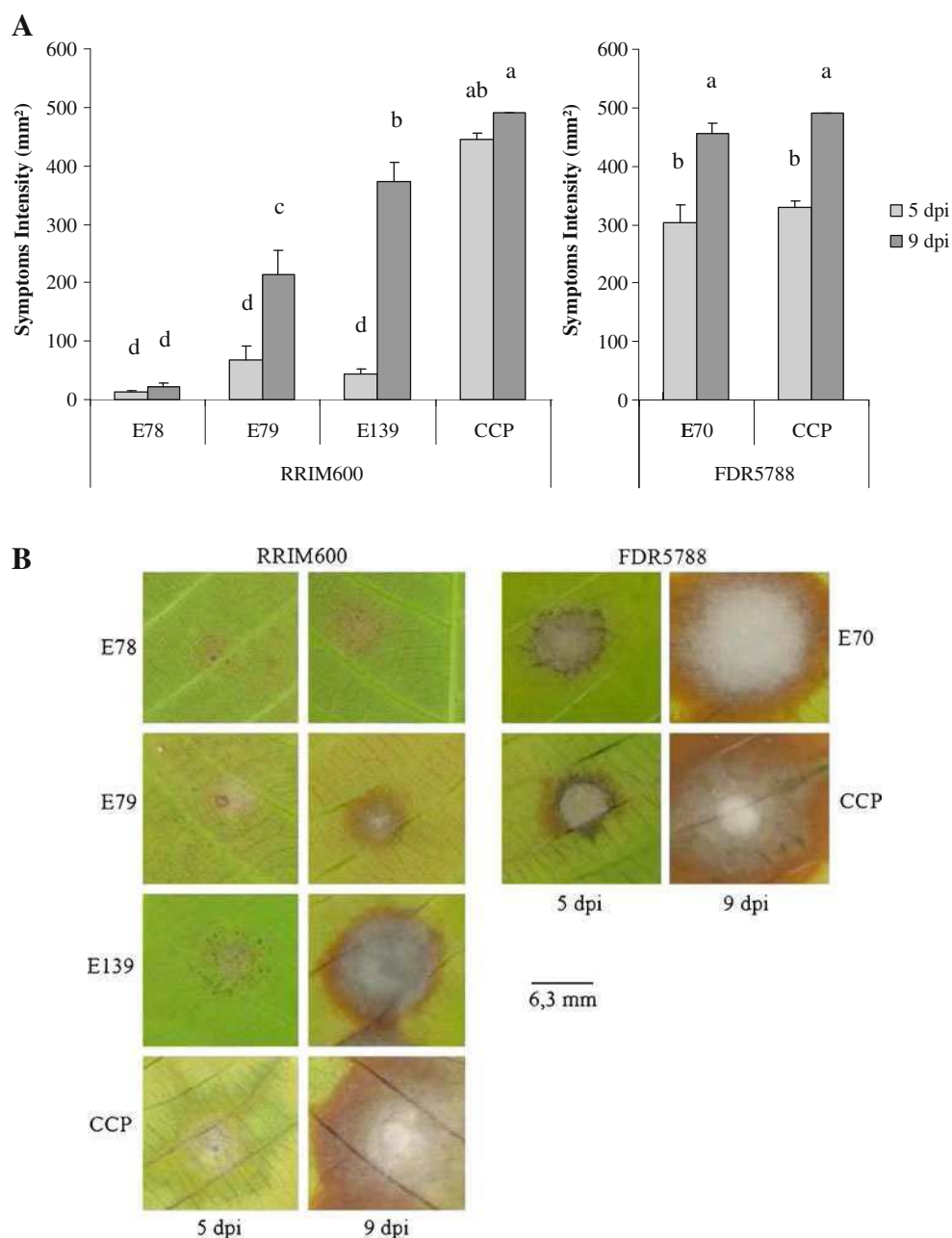
Cas1  MKYLPILISAFVAAAAAAPQDPS-AVAPVLPRQTCVSCVNFGNGFCGDNCGNSWACSGC
Cas2  MKYLPIFISAFVAAAAVPQGPSAAAAAILPRQSCVSCVDFGNGFCGDNCGNSWACSGC
Cas3  MKYLPILISAFVAAITAAPQDPS-AVAPLLPRQSCVSCVNFGNGFCGDNCGNSWACSGC
Cas4  MKYLPILISAFVAAVTAAPQDPS-AVAPLLPRQSCVSCVNFGNGFCGDNCGNSWACSGC
*****:*****:*.**.**.*.*.:****:*****:*****

```

**Fig. 2** The amino acids sequence alignment of the cassiicolin precursor proteins Cas1 (ABV25895), Cas2 (ADC54229), Cas3 (AFH88923 and AFH88924) and Cas4 (AFH88925 and AFH88926). The mature cassiicolin domain is indicated by bold letters. The signal peptide is

underlined. CLUSTAL W annotation: conserved amino acids (\*); amino acids of strongly similar properties (:); amino acids of weakly similar properties (.)

**Fig. 3** Pathogenicity of four endophytic *C. cassiicola* isolates in a detached-leaf assay under controlled conditions. Isolates were inoculated onto the detached leaves of their respective original host rubber tree cultivar and pathogenic CCP strain was used as a control for both cultivars. For each isolate, six leaves were inoculated, each with ten drops of conidia suspension and one drop of water as untreated control. The lesion area per leaf was measured manually, at 5 and 9 dpi. The entire experiment was conducted three times. Panel **a**: Symptoms Intensity expressed as the mean lesion area  $\pm$  the standard error from the 18 inoculated leaves. For each cultivar, values followed by the same letter were not significantly different, according to Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ). Panel **b**: Visual symptoms



#### Kinetics of *Cas* gene homologues expression post-inoculation

The relative expression level of the *Cas1*, *Cas3* and *Cas4* genes was determined at 1, 2, 5 and 9 dpi. Only *Cas1* from isolate CCP was expressed in RRIM 600 and FDR 5788 cultivars (Fig. 5). No *Cas3* or *4* transcripts were detected post-inoculation at any time point for any of the endophytic isolates. The *Cas1* expression profile in RRIM 600 was as expected based on previous analyses (Déon et al. 2012), with a transient peak of expression at 2 dpi. In FDR 5788, no peak of expression was observed and the *Cas1* relative expression remained similarly low at all time points.

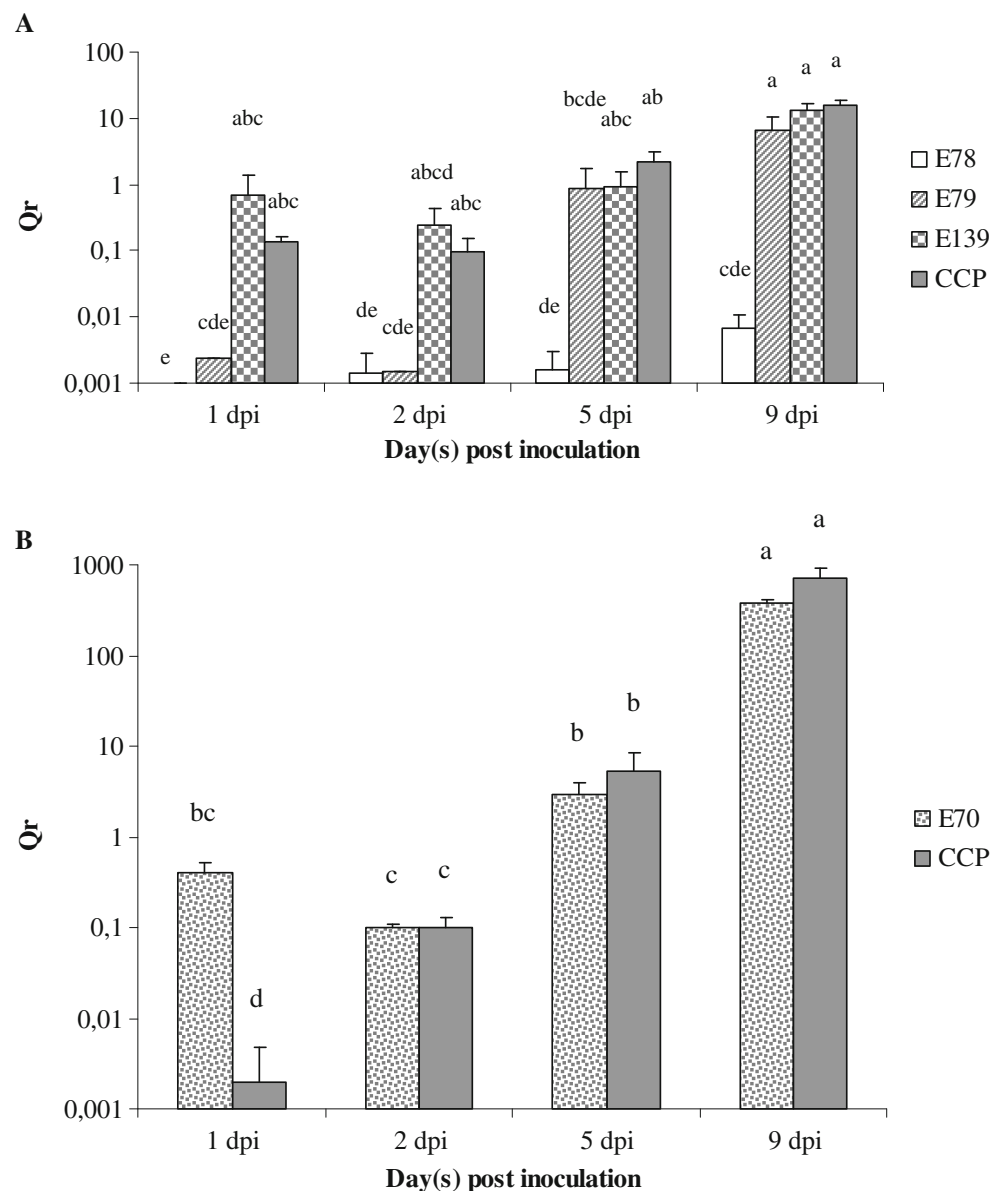
#### Discussion

##### Diversity of the fungal endophytes in *Hevea brasiliensis*

There are still only a few studies investigating endophytic fungi in *Hevea brasiliensis*. The largest analysis was performed on wild rubber trees from Peru and compared the diversity of endophytic fungi in leaves and sapwood (Gaziz and Chaverri 2010). A second study was conducted on cultivated rubber trees from rubber plantations in Bahia, Brazil with the objective of identifying antagonists to *Microcyclus ulei*, another fungal pathogen of the rubber tree (Rocha et al. 2011). In our study, as in the study by Rocha et



**Fig. 4** Colonization of *C. cassiicola* mycelia in rubber tree leaf tissues post-inoculation measured by real-time PCR. The kinetics of *C. cassiicola* mycelia growth at 1, 2, 5 and 9 days post inoculation of the (a) RRIM 600 cultivar and (b) FDR 5788 cultivar were quantified by calculating the relative expression ( $Q_r$ ) of a *C. cassiicola*-specific *EF1 $\alpha$*  gene normalized to a rubber tree-specific *polyubiquitin* gene. Data presented are means  $\pm$  standard error of three independent replicates. Values followed by the same letter were not significantly different according to Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ )

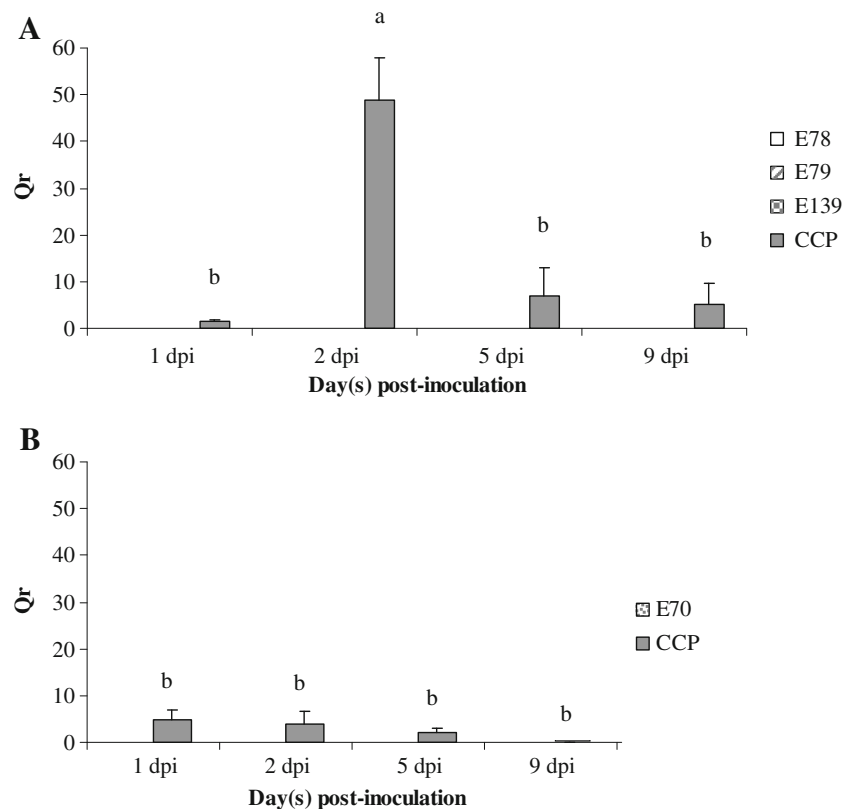


al., all of the isolates identified were Ascomycetes. Gazis and Chaverri (2010) found that Ascomycetes were dominant (97 % of the isolates), but Zygomycota and Basidiomycota were also represented (2 % and 1 %, respectively), in agreement with the hypothesis that biodiversity is more important in the wild than in plantations. However, the identity and prevalence of the various isolated species varied among these three studies. In our study, the dominant genera were *Colletotrichum* (49 %), *Phomopsis* (15 %) and *Nigrospora* (13 %). Among these genera, only *Colletotrichum* and *Phomopsis* were found in all three studies. In the populations isolated from wild rubber trees from Peru (Gazis and Chaverri 2010), *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* and *Penicillium* genera predominated (23 %, 22 % and 18 % of all isolates). Surprisingly, none of these genera were isolated in the course of this study or by Rocha et al. (2011). This could be explained

by the difference in geographical origin or cultivation history of the rubber trees. Gazis and Chaverri (2010) sampled wild rubber trees from the most biodiverse and undisturbed area of the world (Gazis and Chaverri 2010), while our study and Rocha et al. (2011) sampled rubber trees from plantations where biodiversity is clearly less important than in the forest. It should be underlined that Rocha et al. (2011) only provided molecular identification for the strains antagonistic to *Microcyclus ulei*, the causative agent of South American Leaf Blight (SALB), thus giving a partial representation of the endophyte population in the sampled trees. Nevertheless, three genera, *Fusarium*/*Gibberella*, *Myrothecium*, *Pestalotiopsis*/*Pestalosphaeria* and *Microsphaeropsis*/*Paraphaeosphaeria*, identified by Rocha et al. (2011) were not represented among our isolates even though the samples had the same origin of a rubber plantation in Bahia. The

**Fig. 5** Real-time PCR analysis of *Cas* gene expression 1, 2, 5 and 9 days post-inoculation on to the (a) RRIM 600 cultivar and (b) FDR 5788 cultivar.

Data presented are means  $\pm$  the standard error of three independent replicates. Values followed by the same letter were not significantly different according to Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ )



physiological state of the leaves from which the endophytes were isolated, i.e. dry versus fresh leaves, could certainly have influenced the diversity of the recovered endophytic population. Among the specific genera that we found compared to Rocha et al. 2011, several species are known to degrade wood, such as *Xylaria* sp. or *Hypoxylon* sp. (Chaparro et al. 2009). This suggested that our study was selective for species associated with senescent plant material. Supporting this hypothesis, Promputtha et al. (2002) showed that the stage of leaf decomposition in *Magnolia liliifera* had an important impact on the diversity of endophyte populations.

An important result of our study is the identification of four *C. cassiicola* isolates. This is the first report of endophytic *C. cassiicola* in *Hevea brasiliensis*. *C. cassiicola* is primarily known as a pathogen affecting more than 300 plant species (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> (Farr and Rossman 2011)). However, *C. cassiicola* was also reported as an endophyte of *Quercus ilex* (Collado et al. 1999), *Aegle marmelos* (Gond et al. 2007), *Magnolia liliifera* (Promputtha et al. 2007) and several other trees from tropical forests (Suryanarayanan et al. 2011). The fungus has also been observed as a saprotroph on cucumbers, tomatoes, papaya (Kingsland 1985), *Bambusa* spp. and *Dendrocalamus* spp. (Hyde et al. 2001), *Ischyrolepis subverticella* (Lee et al. 2004) and *Magnolia liliifera* (Promputtha et al. 2007, 2010; Kodsueb et al. 2008).

However, many other plants can support *C. cassiicola* growth as a pathogen, endophyte or saprotroph (Dixon et al. 2009). Our results demonstrate that, even though outbreaks of CLF disease have not yet occurred in South America, *C. cassiicola* is present in rubber trees on the American continent.

Are endophytic *C. cassiicola* isolates latent pathogens or latent saprotrophs?

Many species known to cause disease in plants are regularly isolated from asymptomatic tissues and are therefore also classified as endophytes (Kumar and Hyde 2004; Photita et al. 2004, 2005). Whether these are different subspecies or the same strain able to switch from one lifestyle to another is usually unknown. In the case of cacao (Rojas et al. 2010), haplotype subgroups were distinguished among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates that were preferentially associated with either symptomatic or asymptomatic interactions. However, the isolates collected from asymptomatic tissues were not tested for pathogenicity. In several cases, endophytes inoculated onto their host plant under controlled conditions were found to be pathogenic (Mostert et al. 2000; Photita et al. 2004; Lana et al. 2011). With regard to *C. cassiicola*, Dixon et al. (2009)

showed that all isolates collected from healthy tissue of different plant species were pathogenic to the original host.

We inoculated four endophytic *C. cassiicola* onto detached leaves from their original host cultivar under controlled conditions. The strain E70 isolated from the FDR 5788 rubber tree cultivar induced symptoms when inoculated on the same cultivar, with virulence (Fig. 3) and mycelia colonization (Fig. 4) profiles similar to that of the pathogenic strain CCP. We may therefore wonder whether this endophytic *C. cassiicola* strain is a latent pathogen. This would be very worrying considering that rubber trees were so far spared from the CLF disease in this area. However, these experiments were conducted on detached leaves kept alive under moist environment for up to nine days, which cannot reflect exactly the field conditions. The initiation of the senescence process may have induced a lifestyle transition from endophyte to pathogen, in agreement with previous works showing that some endophytes may become pathogenic when the host plant is stressed (Fisher and Petrini 1992). However, a more probable interpretation would be that the observed symptoms reflect a saprotrophic process rather than parasitism.

Several studies proposed that fungal endophytes become saprotrophs when the host plants senesce (Promputtha et al. 2007, 2010; Okane et al. 2008; Porras-Alfaro and Bayman 2008). The close phylogenetic relationships between endophytes and saprotrophs isolated from healthy, mature and decaying leaves and twigs of *Magnolia liliifera*, including *C. cassiicola* isolates, suggest that these fungi have the ability to change their lifestyle during host senescence (Promputtha et al. 2007). This supports the concept of latent saprotrophism. Promputtha et al. (2010) demonstrated that a *C. cassiicola* endophyte and its saprobic counterpart, which was found during the middle to late stages (8–56 days) of leaf decomposition, were both able to produce laccase. The authors hypothesized that laccase activity from the *C. cassiicola* endophyte allows it to persist as a saprobe during decomposition.

In our study, the *C. cassiicola* strains isolated from asymptomatic rubber tree leaves were inoculated onto detached leaves from their original host cultivar, and the symptoms (necrotic surface area) and mycelium development were measured at various time-points from 1 to 9 days post-inoculation (dpi). This long kinetic revealed different phenotypes among the various isolates and suggested a possible switch from an endotrophic to a saprotrophic lifestyle. Indeed, the three endophytic isolates inoculated on RRIM 600 leaves were still under the virulence threshold at 5 dpi (the pathogenic strain had already induced significant symptoms at this time), but at 9 dpi, two of these isolates (E79 and E139) finally induced symptoms with significant mycelium development. It is possible that senescence-associated modifications of the leaf tissue enabled the penetration of

the mycelium inside the host cells and the saprotrophic development of these strains. It should be noted that some mycelium development could be detected by real-time RT-PCR prior to any visible necrotic symptom, as early as 1 dpi in case of E139, E70 and CCP. We suspect that these isolates may have a phase of epiphytic development before the mycelium penetrates through the cells upon toxin action (necrotrophy) or senescence-induced alteration of the tissues (saprotrophy). In the case of the isolate E78, which remained avirulent even at 9 dpi, we cannot rule out all saprobic activity but the very low amount of mycelium detected at 5 and 9 dpi demonstrated that it is clearly less competitive than the other isolates in senescing tissue.

#### Discovery of new cassiicolin gene homologues

New cassiicolin gene homologues potentially encoding two new cassiicolin precursor protein isoforms (Cas3 and Cas4) were found in the endophytic *C. cassiicola* isolates. Their predicted amino acid sequence is similar to that of the Cas1 reference isoform. In particular, the mature cassiicolin domain is highly conserved, with only one amino acid substitution (S instead of T) at position 2. This amino acid is especially important because it carries the sugar moiety (0-methyl-mannose) of the active cassiicolin (Barthe et al. 2007; de Lamotte et al. 2007). Although the role played by this sugar in toxicity is still unknown, it should be noted that Serine (S), like Threonine (T), can be 0-glycosylated. Therefore, the glycosylation of the toxin is not jeopardized by the T to S substitution.

The cassiicolin gene may be under purifying selection pressure, as indicated by the low ( $<1$ )  $d_N/d_S$  ratios. This suggests that this gene is playing an important functional role in *C. cassiicola*. However, this will have to be confirmed when a higher number of *Cas* gene sequences reflecting *C. cassiicola* evolution history will be available.

Although the genes encoding Cas3 and Cas4 appear structurally functional, no *Cas3* and *Cas4* transcripts could be detected post-inoculation. Therefore, if *Cas3* and *Cas4* genes are functional, it seems that their transcription is negatively controlled under the conditions used in this experiment. We have previously shown (Déon et al. 2012) that *Cas1* is transiently expressed, with a sharp peak of expression at 1 or 2 dpi depending on the cultivar. This was confirmed in this work for RRIM 600 inoculated with CCP. In the cultivar FDR 5788 inoculated with CCP, *Cas1* was expressed, but no peak of expression was observed. We suggest that the peak may have occurred at a different time-point not tested in this experiment. Whether *Cas3* and *Cas4* can be switched on and under which conditions is unknown. In our analysis, some of the endophytic isolates induced necrosis on detached leaves five or nine days post-inoculation, although the corresponding *Cas* genes were not expressed,

suggesting that symptoms under these specific conditions are not mediated by the Cas3 or Cas4 proteins. This supports the idea that *C. cassiicola* can penetrate senescing tissues without the support of the Cas toxin and develop as a saprobe. The exact role of cassiicolin in the early phase of development and its ability to cause disease in intact plants needs to be further explored, over short time scales post inoculation.

## Conclusion

In this work, we demonstrated that *C. cassiicola* is present in rubber plantations in Brazil in an endophytic form. Among the four isolates found, three were able to induce disease symptoms in a detached-leaf assay using rubber tree leaves under controlled conditions. This could be the manifestation of a saprotrophic lifestyle, although a pathogenic ability is not excluded, at least for one of the isolates. Whatsoever, our results suggest that the new *Cas* gene homologues identified in these isolates were not involved under the conditions used in this study. *C. cassiicola* affects many other plants in Brazil. It is possible that cassiicolin gene homologues play a role in other hosts and that their expression requires specific host plant signals. Rubber trees may serve as inoculum reservoir for these plants. Further studies conducted on whole plants are necessary to understand which parameters control *C. cassiicola* development and lifestyle. Potential antagonistic effects from other microorganisms should also be considered. The fungal endophytes isolated in this study in parallel with *C. cassiicola* are good candidates for antagonists to *C. cassiicola*. The exact role of cassiicolin and other potential effectors in the interaction between *C. cassiicola* and the rubber tree should also be investigated further.

**Acknowledgements** This work was supported in part by a grant from the IFC (Institut Français du Caoutchouc, Paris, France) and the companies Michelin (Clermont-Ferrand, France), SIPH (“Société Internationale de Plantations d’Hévéas”, Courbevoie, France) and SOCFIN (“Société Financière des Caoutchoucs”, Bruxelles, Belgium). We thank Boris Fumanal and Jean-Stéphane Vénisse for their valuable comments.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- Atan S, Hamid NH (2003) Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *J Rubber Res* 6(1):58–64
- Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, Roumestand C, de Lamotte F (2007) Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *J Mol Biol* 367(1):89–101
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340(4):783–795
- Breton F, Sanier C, d’Auzac J (2000) Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *J Rubber Res* 3(2):115–128
- Cai L, Ji K-F, Hyde K (2006) Variation between freshwater and terrestrial fungal communities on decaying bamboo culms. *Antonie van Leeuwenhoek* 89(2):293–301. doi:10.1007/s10482-005-9030-1
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11(2):113–116
- Chaparro DF, Rosas DC, Varela A (2009) Isolation of wood-decaying fungi and evaluation of their enzymatic activity (Quindío, Colombia). *Rev Iberoam Micol* 26(4):238–243
- Chee KH (1988) Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on hevea rubber. *J Nat Rubber Res* 3:21–29
- Chee KH (1990) Rubber diseases and their control. *Rev Plant Pathol* 69(7):423–430
- Collado J, Platas G, Gonzalez I, Pelaez F (1999) Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol* 144(3):525–532
- Darmono TW, Darussamin A, Pawirosoemardjo S (1996) Variation among isolates of *Corynespora cassiicola* associated with *Hevea brasiliensis* in Indonesia. In: Proceeding workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber. Medan, Indonesia, 16–17 December, pp 79–91
- de Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Thai R, Poncet J, Bieysse D, Breton F, Pujade-Renaud V (2007) Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *J Chromatogr B* 849(1–2):357–362
- Déon M, Bourré Y, Gimenez S, Berger A, Bieysse D, de Lamotte F, Poncet J, Roussel V, Bonnot F, Oliver G, Franchel J, Seguin M, Leroy T, Roeckel-Drevet P, Pujade-Renaud V (2012) Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Sci* 185–186:227–237. doi:10.1016/j.plantsci.2011.10.017
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K, Datnoff LE (2009) Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99(9):1015–1027. doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2011) Geneious v5.4, available from <http://www.geneious.com/>
- Farr DF, Rossman AY (2011) Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, from/fungaldatabases/
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fisher PJ, Petrini O (1992) Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* 120:137–143
- Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecol* 3(3):240–254
- Goldman N, Yang Z (1994) A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Biol Evol* 11:725–736
- Gond SK, Verma VC, Kumar A, Kumar V, Kharwar RN (2007) Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J Microbiol Biotechnol* 23:1371–1375



- Hallé F, Martin R (1968) Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) (Müll. Arg., Euphorbiacées, crotonoïdées). *Adansonia* 8:475–503
- Hyde KD, Ho WH, McKenzie EHC, Dalisay T (2001) Saprobiic fungi on bamboo culms. *Fungal Divers* 7:35–48
- Jayasinghe CK, Silva WPK (1996) Current status of *Corynespora leaf fall* in Sri Lanka. In: Proceeding on the Workshop on *Corynespora Leaf Fall Disease*, Medan, Indonesia, pp 3–5
- Jayasinghe CK, Silva WPK, Wettasinghe DS (1998) *Corynespora cassiicola*: a fungal pathogen with diverse symptoms on *Hevea* rubber. *Bull Rubber Res Inst Sri Lanka* 39:1–5
- Junqueira NTV, Gasparotto L, Moraes VHF, Silva HM, Lim TM (1985) New diseases caused by virus, fungi and also bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. In: Proceeding of the regional conference on plant quarantine support for agricultural development, Kuala Lumpur, Malaysia, 10–12 December, pp 253–260
- Kingsland GC (1985) Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the Republic of the Seychelles. *Acta Horti (ISHS)* 153:229–230
- Kodsueb R, MacKenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD (2008) Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Divers* 30:37–53
- Koenning SR, Creswell TC, Dunphy EJ, Sikora EJ, Mueller JD (2006) Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. *Plant Dis* 90(7):974. doi:10.1094/PD-90-0974C
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580
- Kumar D, Hyde K (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Divers* 17:69–90
- Lana T, Azevedo J, Pomella A, Monteiro R, Silva C, Araujo W (2011) Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are distinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genet Mol Res* 10(1):326–334
- Lee S, Melnik V, Taylor J, Crous P (2004) Diversity of saprobic hyphomycetes on *Proteaceae* and *Restionaceae* from South Africa. *Fungal Divers* 17:91–114
- Liyanage NIS, Liyanage AS (1986) A study on the production of toxin in *Corynespora cassiicola*. *J Rubber Res Inst Sri Lanka* 65:51–53
- Liyanage AS, Jayasinghe CK, Liyanage NIS, Jayaratne AHR (1986) *Corynespora* Leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*)—a new report. *J Rubber Res Inst Sri Lanka* 65:47–50
- Mostert L, Crous PW, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52(1):46–58
- Nei M, Kumar S (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York
- Newsam A (1960) Plant Pathology Division Report. Rubber Research Institute of Malaysia
- Nugawela A, Liyanage NIS, Liyanage AS, Aluthewage RK (1989) Influence of infection by *Corynespora cassiicola* on carbon dioxide assimilation rate in *Hevea* leaves. *J Nat Rubber Res* 4(4):233–238
- Okane I, Srikitikulchai P, Toyama K, Læssøe T, Sivichai S, Hywel-Jones N, Nakagiri A, Potacharoen W, Suzuki K-I (2008) Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience* 49(6):359–372. doi:10.1007/s10267-008-0440-6
- Oliveira RR, Vida JB, Tessmann DJ, Aguiar BM, Caixeta MP (2006) Reação de híbridos de pepino para cultivo protegido a isolados de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatol Bras* 31:509–512
- Oliveira RR, Vida JB, Tessmann DJ, BdM A, Caixeta MP, Barboza AL (2007) Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa Phytopathol* 33:297–299
- Onesirosan P, Mabuni CT, Durbin RD, Morin RB, Righ DH, Army DC (1975) Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiol Plant Pathol* 5:289–295
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC (2004) Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Divers* 16:131–140
- Photita W, Taylor P, Ford R, Hyde K, Lumyong S (2005) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Divers* 18:117–133
- Pongthep K (1987) *Corynespora* disease of *Hevea* in Thailand. In: Proceedings of the IRRDB Symposium. Chiang Mai, Thailand, 2–3rd Nov, pp 1–17
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2008) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49(1):291–315. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081831
- Promptutha I, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD (2002) Fungal succession of senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. *Fungal Divers* 10:89–100
- Promptutha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EH, Hyde KD, Jeewon R (2007) A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microb Ecol* 53(4):579–590
- Promptutha I, Hyde K, McKenzie E, Peberdy J, Lumyong S (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Divers* 41(1):89–99. doi:10.1007/s13225-010-0024-6
- Purwantara A (1987) A histological study of hevea leaves infected by *Corynespora cassiicola*. *Menara Perkebunan* 55:47–49
- Qi Y, Xie Y, Zhang X, Pu J, Zhang H, Huang S, Zhang H (2009) Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Mol Biotechnol* 41(2):145–151
- R\_Development\_Core\_Team (2009) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet* 101:948–955
- Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araujo IS, Mattos CRR, Goes-Neto A (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Divers* 47:75–84
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng Y-Q, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102(6):1318–1338. doi:10.3852/09-244
- Romruensukharom P, Tragoonrun S, Vanavichit A, Toojinda T (2005) Genetic variability of *Corynespora cassiicola* population in Thailand. *J Rubber Res* 8(1):38–49
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sallaud C, Meynard D, van Bostel J, Gay C, Bès M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PBF, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa*) functional genomics. *TAG Theor Appl Genet* 106(8):1396–1408. doi:10.1007/s00122-002-1184-x
- Schlub RL, Smith LJ, Datnoff LE, Perenzny K (2009) An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Horti* 808:25–28

- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, de Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EBG, Kohlmeyer J, Kruys Á, Li YM, Lücking R, Lumbsch HT, Marvanová L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJL, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Rivas Plata E, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann-Kohlmeier B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JHC, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW (2009) A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. *Stud Mycol* 64:1–15
- Shamsul KAS, Shamsuri MH (1996) Current status of *Corynespora* leaf fall in Malaysia. In: Proceeding of the workshop on *Corynespora* Leaf Fall disease. Medan, Indonesia, pp 21–28
- Sinulingga W, Suwanto, Soepena H (1996) Current status of *Corynespora* leaf fall on Hevea rubber in Indonesia. In: Proceeding of the workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease. Medan, Indonesia, pp 7–11
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G (2002) Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Can J Bot* 80:818–826
- Suryanarayanan T, Murali T, Thirunavukkarasu N, Govinda Rajulu M, Venkatesan G, Sukumar R (2011) Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers Conserv* 20(5):913–928. doi:10.1007/s10531-011-0004-5
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Wahounou PJ, Tran Van Canh C, Keli JZ, Eschbach JM (1996) Development of *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum gloesporioides* leaf fall diseases in rubber plantation in Africa. In: Proceeding of the workshop on *Corynespora* Leaf Fall disease. Medan, Indonesia, pp 99–106
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic, San Diego

**Electronic supplementary material 1 (ESM1)**

Identification of the fungal endophytes isolated from asymptomatic rubber tree leaves from a plantation in Bahia (Brazil). Identification was performed by Blast analysis of the internal transcribed spacers (ITS) of the ribosomal DNA.

Endophytic isolate	Accession number	ITS region			Identification in GenBank	Blast match in GenBank
		Lenght (bp)	Coverage (%)	Identity (%)		
E51	JQ814301	490	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU734580
E56.1	JQ814304	487	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ026737
E58	JQ814307	487	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ022504
E60	JQ814309	503	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM222960
E62.2	JQ814312	447	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ868520
E66.1	JQ814316	487	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ026736
E66.2	JQ814317	487	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ022364
E67	JQ814318	506	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ868520
E69	JQ814320	485	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968595
E73	JQ814324	445	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ026736
E74	JQ814325	486	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM595504
E77	JQ814328	495	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016794
E113	JQ814336	485	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ026737
E115	JQ814338	501	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016797
E118	JQ814340	454	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM855214
E119	JQ814341	503	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016796
E120	JQ814342	418	99,5	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ022370
E121	JQ814343	504	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016794
E122	JQ814344	502	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016795
E123	JQ814345	500	99,4	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016794
E124	JQ814346	496	99,4	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016794
E125	JQ814347	503	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016795
E128	JQ814348	503	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016795
E131	JQ814351	487	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ022352
E136	JQ814356	503	99,4	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ455528
E142	JQ814359	504	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM222960
E147	JQ814363	500	99,6	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ455528
E153	JQ814365	505	99,8	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016796
E81	JQ814332	487	99,6	100	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	GU994357
E114	JQ814337	454	100	100	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	GU994360
E134	JQ814354	512	99,6	100	<i>Colletotrichum acutatum</i>	AJ301921
E135	JQ814355	499	99,8	100	<i>Glomerella acutata</i>	FJ968598
E132	JQ814352	485	99,6	100	<i>Glomerella cingulata</i>	GQ410773
E111	JQ814334	502	99,2	99,8	<i>Phomopsis longicolla</i>	EU236702
E130	JQ814350	459	98,5	100	<i>Phomopsis sp.</i>	EF687935
E72	JQ814323	506	99,4	100	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	FJ441609
E112	JQ814335	494	100	100	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	HM855212
E129	JQ814349	502	100	100	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AY577815
E144	JQ814361	503	99,4	100	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JF896458
E71	JQ814322	488	99,8	100	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312351
E141	JQ814358	506	99,6	100	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312351
E57	JQ814306	493	99,6	99,8	<i>Diaporthe conorum</i>	DQ116552
E82	JQ814333	491	99	100	<i>Diaporthe sp.</i>	EF423524
E56.2	JQ814305	426	99,8	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN211105

Endophytic isolate	Accession number	ITS region			Identification in GenBank	Blast match in GenBank
		Lenght (bp)	Coverage (%)	Identity (%)		
<b>E61</b>	JQ814310	470	100	99,6	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E62.1</b>	JQ814311	472	99,8	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E64</b>	JQ814314	470	100	99,6	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E68</b>	JQ814319	470	100	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E80</b>	JQ814331	470	100	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E133</b>	JQ814353	465	99,8	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN211105
<b>E143</b>	JQ814360	469	100	99,8	<i>Nigrospora oryzae</i>	JN185456
<b>E149</b>	JQ814364	428	100	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	HQ608152
<b>E63</b>	JQ814313	500	99,6	100	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098
<b>E54</b>	JQ814303	498	100	100	<i>Xylaria sp.</i>	HQ008887
<b>E75</b>	JQ814326	509	99,6	100	<i>Xylaria sp.</i>	EF423531
<b>E76</b>	JQ814327	506	99,6	100	<i>Xylaria sp.</i>	EF423531
<b>E116</b>	JQ814339	533	98,9	99,4	<i>Xylaria sp.</i>	FJ799952
<b>E70</b>	JQ814321	489	99,8	100	<i>Corynespora cassicola</i>	FJ624260
<b>E78</b>	JQ814329	481	100	100	<i>Corynespora cassicola</i>	FJ852696
<b>E79</b>	JQ814330	480	100	100	<i>Corynespora cassicola</i>	GU066725
<b>E139</b>	JQ814357	430	100	100	<i>Corynespora cassicola</i>	FJ852665
<b>E146</b>	JQ814362	570	100	100	<i>Guignardia mangiferae</i>	EU677805
<b>E157</b>	JQ814366	566	100	100	<i>Guignardia mangiferae</i>	EU677815
<b>E53</b>	JQ814302	483	99,8	100	<i>Daldinia eschscholzii</i>	FJ624265
<b>E50</b>	JQ814300	269	99,6	94,42	<i>Hypoxylon polyporus</i>	AM749941
<b>E59</b>	JQ814308	484	97,1	100	<i>Alternaria pseudorostrata</i> <i>Leptosphaerulina chartarum</i>	JN383483
<b>E65</b>	JQ814315	533	100	100		EU529996

**Electronic supplementary material (ESM2)**

List of all the primers used in the study

Primer name	Sequence (5'.....3')
CasF12	GTAAGCTGTGTCAATTTTCGGC
CasR16	GGATCCGTAAGAGTATAAATTTGTGTATG
CasR19	TGTTCTGGGATGTTAACTTTTG
CasF11	GTACTCCCTAGACAGACTTGC
CasR20	AGCCCAAGAATTACCACAGTT
CasF9	ATCAATTCCAAATCTTGAAAATCTGTCC
CasF14	CGGCAGCAGCTATTCTTC
CT1R16	GGATCCGTAAGAATATAAATTTGTGTATG
CasR22	GAAGAATAGCTGCTGCCG
CasW-E70-F04	CCATTACTGCGGCTCCACAAGATCC
CasW-E70-R04	GGAGCAAAGGTGCCACAGCAGACGGA
CasW-E70-F05	CGTCTGCTGTGGCACCTTTGCTC
CasW-E70-R01	CGAAAGCCGAGATGAGGATAGGGAGG
CasF20	GTCGGCTAACTTGGGAAAACTCT
CasR28	GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG
ADPR1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGCCGCCCGGGGAGGT
ADPR2	P-ACCTCCCC-NH <sub>2</sub>
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC
Cc-qCas1-R2	GGTAATTCTTGGGCTTGTTCGGGATG
Cc-qCas3,4-F1	GTATCGTGTGTCAATTTTGGC
Cc-qCas3,4-R1	CAGCCCGAACAAGCCAGGAATTGCC
Cc-qCas1,3,4-F1	CAAGATCCGTCTGCTGT
Cc-qCas1,3,4-R1	CCACAGTTATCGCCACA
Cc-qEF1 $\alpha$ -F1	CACCGTCATTGACGCCCCC
Cc-qEF1 $\alpha$ -F3	CACCGTCATTGACGCCCCT
Cc-qEF1 $\alpha$ -R1	GGTACTGGTGAGTTCGAGGC
Cc-qActin-F2	CAACATTGTCATGTCTGGTGG
Cc-qActin-R2	TTGCGCTCGGGGGGAGCA
Nc-EF1 $\alpha$ -F2	ATATCGCCCTCTGGAAGTT
Cc-EF1 $\alpha$ -R1	GGCGTTGAAGGACTCAGCAC
Cc-Actin-F4	CCCATCTACGAGGGTTTC
Cc-Actin-R1	CTCTCGTCGTACTCCTGC
Hb-Ubi-F	TTTTCGTGAAAACCCTCACC
Hb-Ubi-R	CCGTCTTCAAGCTGTTTTCC

**Electronic supplementary material 3 (ESM3):** The nucleotide sequence alignment of the cassiicolin genes from the endophytic isolates CCP (EF667973), CC004 (GU373809), E70 (JF915169), E78 (JF915170), E79 (JF915171), E139 (JF915172). The amino acid sequence from the CCP Cassiicolin gene is indicated on top of the alignment, with the modified amino acids colored in grey. The nucleotides inducing positive substitutions in the amino acids sequence, compared to CCP, are coloured in yellow. CLUSTAL W annotation: conserved amino acids (\*); amino acids of strongly similar properties (:); amino acids of weakly similar properties (.).

CCP	-GACTTTTCTTAAGTATCATCAATTCCAAATCTTGAAAATCTGTCCTATACATTTGCTAC	59
CC004	TACGTTTCTTAAC-CACTATCAGTTCGAAATCTTTGAGACCTGTCCTATATATTGCTAC	59
E70	-AAATCTTCTAAA-CATTGTGCGATTCCAGATCTTTCAAACCTGTCCCATACATTTGCTAC	58
E78	-AAATCTTCTAAA-CATTGTGCGATTCCAGATCTTTCAAACCTGTCCCATACATTTGCTAC	58
E79	-AAATCTTCTAAA-CATTGTGCGATTCCAGATCTTTCAAACCTGTCCCATACATTTGCTAC	58
E139	-AAATCTTCTAAA-CATTGTGCGATTCCAGATCTTTCAAACCTGTCCCATACATTTGCTAC	58
	.. * * *:.* * .**.* ** *.***** *. * ***** ** *****	
	M K Y L P I <b>L</b> I S A F V A A <b>V</b> A A <b>A</b> P	
CCP	ACAATGAAATATCTCCCTATCCTCATCTCTGCTTTTGTAGCAGCCGTTGCTGCAGCCCCG	119
CC004	ACAATGAAATATCTCCCTATCTTCATCTCTGCTTTTGTAGCAGCCGTTGCTGCAGTCCG	119
E70	ATAATGAAATACCTCCCTATCCTCATCTCGGCTTTTCGTAGCAGCCATTACTGCGGCTCCA	118
E78	ATAATGAAATACCTCCCTATCCTCATCTCGGCTTTTCGTAGCAGCCATTACTGCGGCTCCA	118
E79	ATAATGAAATACCTCCCTATCCTCATCTCGGCTTTTCGTAGCAGCCGTTACTGCGGCTCCA	118
E139	ATAATGAAATACCTCCCTATCCTCATCTCGGCTTTTCGTAGCAGCCGTTACTGCGGCTCCA	118
	* ***** ***** ***** ***** ***** **.*.***.* **.	
	Q <b>D</b> P S A <b>V</b> A <b>P</b> <b>V</b> L P R Q <b>T</b> C	
CCP	CAAGATCCGTCTGCTGTG---GCACCTGTACTCCCTAGACAGACTTGCGTACGTCTTGAC	176
CC004	CAGG <b>G</b> TCCGTCTGCTG <b>C</b> GGCAGCAGCTATTCTTCCTAGACAGTCTTGCGTACGTCTTGAC	179
E70	CAAGATCCGTCTGCTGTG---GCACCTTTGCTCCCTAGACAGTCTTGCGTACGTCTTGAC	175
E78	CAAGATCCGTCTGCTGTG---GCACCTTTGCTCCCTAGACAGTCTTGCGTACGTCTTGAC	175
E79	CAAGATCCGTCTGCTGTG---GCACCTTTGCTCCCTAGACAGTCTTGCGTACGTCTTGAC	175
E139	CAAGATCCGTCTGCTGTG---GCACCTTTGCTCCCTAGACAGTCTTGCGTACGTCTTGAC	175
	**.*.***** * *** * * * *****:*****	
CCP	TCA-CAAAAGCGCGATTAG---AAAAGAGATGAAAAGGTTGTAGCTAATAATTAGTAAAG	233
CC004	TTATCAAAGCACGATCAGAAAAAATGAAACAATTTG----TAACTAATAATTGGTAAAG	235
E70	TCATCGAATGACAGCCAGG--AAATGAAACAACATG----TAGCTAATAGTAGATAAAG	229
E78	TCATCGAATGACAGCCAGG--AAATGAAACAACATG----TAGCTAATAGTAGATAAAG	229
E79	TCATCGAATGACAGCCAGG--AAATGAAACAACATG----TAGCTAATAGTAGATAAAG	229
E139	TCATCGAATGACAGCCAGG--AAATGAAACAACATG----TAGCTAATAGTAGATAAAG	229
	* * *.*. . . :.. ***:*. * * ::* **.******.*:..*****	
	V S C V <b>N</b> F G N G F C G D N C G N S W A	
CCP	TAAGCTGTGTCAATTTTCGGCAATGGGTTTGTGGCGATAACTGTGGTAATTCCTGGGCTG	293
CC004	TATCATGTGTG <b>G</b> ATTTTCGGCAACGGGTTCTGTGGCGACAACCTGTGGTAATTCCTGGGCTG	295
E70	TATCGTGTGTCAATTTTGGCAATGGGTTCTGTGGCGATAACTGTGGCAATTCCTGGGCTG	289
E78	TATCGTGTGTCAATTTTGGCAATGGGTTCTGTGGCGATAACTGTGGCAATTCCTGGGCTG	289
E79	TATCGTGTGTCAATTTTGGCAATGGGTTCTGTGGCGATAACTGTGGCAATTCCTGGGCTG	289
E139	TATCGTGTGTCAATTTTGGCAATGGGTTCTGTGGCGATAACTGTGGCAATTCCTGGGCTG	289
	** : *****.***** ***** ***** ***** ***** *****	

		C S G C	
CCP	TAAGTGCTTTG--TCTGTTTCTCAAATCTAAAGCTAATTTGCATGCAGTGTTCGGGATGT		351
CC004	TAAGTATTTAATATCTGTTTCTTGATTCTAAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGATGT		355
E70	TAAGTATTTAACATCTGTTTCTCAAATCTAAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGCTGT		349
E78	TAAGTATTTAACATCTGTTTCTCAAAGCTAAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGCTGT		349
E79	TAAGTATTTAACATCTGTTTCTCAAATCTAAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGCTGT		349
E139	TAAGTATTTAACATCTGTTTCTCAAATCTAAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGCTGT		349
	*****. **: . ***** . *: ***** ***** . ***** . ***		
CCP	<u>TA</u> ACTTTGGTAGCATTCCAAAGAATTGCGGCCCAAGATAGTGTAGCTTGAATATTTGA		411
CC004	<u>TA</u> ACTTTGGTAGCGTTCTAGATAATTGTGGCCTACAAGATAGTGTAGCTTGAATATTTGA		415
E70	<u>T</u> AGCTTAAGTAGCATTCTGGAGAATTGTGGTCCACAAGACAGTCTAGCTTGAATACTATA		409
E78	<u>T</u> AGCTTAAGTAGCATTCTGGAGAATTGTGGTCCACAAGACAGTCTAGCTTGAATAGTATA		409
E79	<u>T</u> AGCTTAAGTAGTATTCTGGAGAATTGTGGTCCACAAGACAGTCTAGCTTGAATACTATA		409
E139	<u>T</u> AGCTTAAGTAGTATTCTGGAGAATTGTGGTCCACAAGACAGTCTAGCTTGAATACTATA		409
	** . *** : . ***** . *** . . * ***** * * * ***** * * * ***** * : *		
CCP	GCTAGCTGCCGCTACAAGTCTATAGGATGGCAACCTTAGCTACCTATACG--CAAGTCTC		469
CC004	GCTGGCTGCCGCTACAAGTCTAAAGGATGGCAACCTTAGCTACCTATACG-CAAGTA-TC		473
E70	GCTAGCTGTTGCTACAAGTCTACAGGGTGGCAGCACTGATTGCCTATATAGGCAATT-TG		468
E78	GCTAGCTGTTGCTACAAGTCTACAGGGTGGCAGTACTGATTGCCTATATAGGCAATT-TG		468
E79	GCTAGCTGTTGCTACAAGTCTACAGGGTGGCAGTACTGATTGCCTATATAGGCAAAATTG		469
E139	GCTAGCTGTTGCTACAAGTCTACAGGGTGGCAGTACTGATTGCCTATATAGGCAAAATTG		469
	*** . ***** ***** ***** . . * . . * . ***** . . * : *		
CCP	TTGCTCCTAGGTTGTTTAGACCGATTTAAATGTTATGTGTATATAATTAGCGCTACATAT		529
CC004	TTACTTCTAGGTCGTTTAGACCAATTTTCATATTATGTGTATATACTTAGCGCTACATAT		533
E70	TTGCTACCAAGTATTCTGGACTGTTTCTCTCGTTACTTGTATATACTTGGCGCTATATAT		528
E78	TTGCTACCAAGTATTCTGGACTGTTTCTCTCGTTACTTGTATATACTTGGCGCTATATAT		528
E79	TTGCTACCAAGTATTCTGGACTGTTTCTCTCGTTACTTGTATATACTTGGCGCTATATAT		529
E139	TTGCTACCAAGTATTCTGGACTGTTTCTCTCGTTACTTGTATATACTTGGCGCTATATAT		529
	** . ** * * . ** * * . ** . ** . : ** : . : . *** ***** . ** . ***** ****		
CCP	ACACCACACTCCTTTACATACA-CAAATTTTATACTCTTACGGATCC		574
CC004	ACACCACACTCCTTTACATACA-CAAATTTTATACTCTTACGGATCC		578
E70	ACACCACACTTATTTACATACCGCAAATCCAAATCCTTGCAGATCC		574
E78	ACACCACACTTATTTACATACCGCAAATCCAAATCCTTGCAGATCC		574
E79	ACACCACACTCATTTACATACCGCAAATCCAAATCCTTGCAGATCC		575
E139	ACACCACACTCATTTACATACCGCAAATCCAAATCCTTGCAGATCC		575
	***** . ***** . ***** * : * *** . * . *****		

## Chapitre 2 - Résultats complémentaires.

### Recherche d'antagonistes de *C. cassiicola* parmi les endophytes fongiques de l'hévéa

#### Introduction

Nous avons montré que des souches de *C. cassiicola* étaient présentes à l'état endophyte dans les feuilles d'hévéa asymptomatiques, prélevées au Brésil, dans une zone jusque là indemne d'épidémie de CLF. Les clones d'origine sur lesquels ces souches avaient été prélevées ne sont pas intrinsèquement résistants à ces isolats puisque des symptômes ont été observés en conditions d'inoculation contrôlée sur feuilles détachées.

Nous avons voulu tester l'hypothèse d'une possible interaction antagoniste entre les souches de *C. cassiicola* endophytes et les autres champignons endophytes présents dans les mêmes tissus foliaires. Pour cela, nous avons réalisé des tests de co-culture *in vitro*, en confrontant une souche de *C. cassiicola* avec une souche d'une autre espèce d'endophyte et en mesurant le pourcentage d'inhibition de croissance de la souche de *C. cassiicola* en co-culture, par rapport à son témoin en culture isolée. Une souche de chacune des espèces d'endophytes que nous avons isolées a été testée. Nous avons également testé le pouvoir antagoniste d'une cinquantaine d'isolats endophytes appartenant aux genres *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* et *Trichoderma*, prélevées sur des hévéas sauvages du Pérou ou en plantation au Cameroun. Ces souches nous ont été fournies par le Dr Priscila Chaverri (Université du Maryland, USA). Parmi ces isolats, les espèces *Pestalotiopsis aff. Palmarum* et *Trichoderma harzianum* ont été identifiées comme étant les plus représentées (Gazis and Chaverri 2010). De plus, l'effet antagoniste des espèces du genre *Trichoderma* contre divers agents pathogènes fongiques est maintenant bien documenté (De Souza et al. 2008; Hanada et al. 2008), et les espèces du genre *Pestalotiopsis* et *Colletotrichum* sont connues pour produire des substances bioactives ayant des propriétés antifongiques (Inácio et al. 2006; Tejesvi et al. 2003; Li et al. 2008). Les endophytes de ces trois genres sont donc de bons candidats pour l'identification d'antagonistes de *C. cassiicola*.

#### Résultats

Les résultats de l'analyse des souches de *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* et *Trichoderma* ont été présentés sous forme de poster lors du congrès IMC9 (1-6 August 2010, Edinburgh, UK) (Annexe 1). Des pourcentages d'inhibition de croissance de 15 à 30% ont été observés pour toutes les souches, avec des différences significatives en fonction des espèces au sein d'un même genre, mais pas de corrélation avec l'espèce hôte d'origine (*H. brasiliensis* versus *H. guianensis*), le tissu d'origine (feuilles versus sève), ou l'historique (hévéa de plantation versus hévéa sauvage).





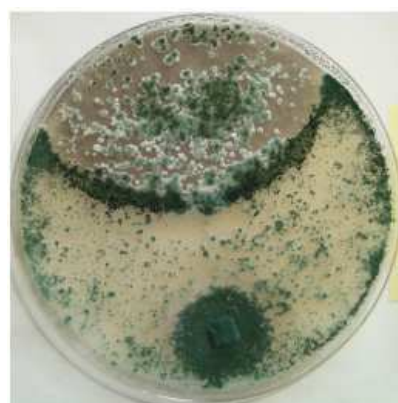
***C. cassicola* (E70)**



***Xylaria* sp. vs E70**



***Xylaria* sp. vs E70**



***Trichoderma* sp. vs E70**

**Figure 15 :** Illustration du mycoparasitisme engendré par des souches de *Xylaria* et *Trichoderma* sur *C. cassicola*.

Les résultats obtenus avec les endophytes que nous avons isolés (provenant de plantations brésiliennes) testés contre deux souches de *C. cassiicola* endophytes (E55 et E70) sont encore préliminaires mais ils révèlent des pourcentages d'inhibition beaucoup plus importants qu'avec les endophytes du Pérou et du Cameroun. Des pourcentages d'inhibition de croissance de 50 à 60% ont pu être observés pour des isolats appartenant aux genres *Daldinia*, *Diaporthe* ou encore *Phomopsis*.

Deux types de comportement on pu être observés : certaines colonies mycéliennes s'arrêtent de croître dès qu'elles entrent en contact, avec une inhibition de croissance réciproque de la souche d'endophyte et de la souche de *C. cassiicola*. C'est le cas des espèces de *Pestalotiopsis* et *Colletotrichum*, et de la plupart des espèces que nous avons isolées. Cependant, deux espèces ont montré une capacité à poursuivre leur croissance en envahissant la colonie mycélienne de *C. cassiicola*. Les espèces *Trichoderma spp*, en particulier, envahissent toute la boîte et finissent par sporuler en surface de la colonie de *C. cassiicola* (Fig. 15). On parle alors de mycoparasitisme. C'est le cas également des souches endophytes brésiliennes appartenant au genre *Xylaria* (Fig. 15).

Nos résultats (encore préliminaires) révèlent une plus grande variabilité des effets antagonistes de certains isolats envers E70 comparativement à CCP. En effets, les pourcentages d'inhibition de croissance d'E70 vont de 3 à 29 % alors qu'envers CCP, les pourcentages de croissance vont de 15 à 28%. Par ailleurs, tous les *Trichoderma* testés contre CCP présentaient une activité mycoparasitaire plus ou moins intense alors qu'envers E70 seuls quelques isolats sont mycoparasitaires.

### **Conclusion :**

Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que certaines espèces de champignons endophytes présentes en plantation au Brésil (*Xylaria spp.*) pourraient contribuer à limiter le développement de *C. cassiicola* de part leur pouvoir mycoparasitaire. Il faudrait cependant vérifier cette hypothèse *in planta*. Quand aux espèces du genre *Trichoderma*, réputées pour leur potentiel en lutte biologique, elles ouvrent des perspectives très intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre *C. cassiicola*.



# CHAPITRE 3

**Evolutionary history and pathogenicity of  
*Corynespora cassiicola* with a special emphasis on  
*Hevea brasiliensis***

Article en préparation



## Evolutionary history and pathogenicity of *Corynespora cassiicola* with a special emphasis on *Hevea brasiliensis*

Marine Déon<sup>a,b</sup>, Boris Fumanal<sup>b</sup>, Stéphanie Gimenez<sup>c,d</sup>, Ricardo R. Oliveira<sup>e</sup>, Siti Suhada Shuib<sup>f</sup>, Daniel Bieysse<sup>d</sup>, Marc Seguin<sup>a</sup>, Sunderasan Elumalai<sup>f</sup>, João B. Vida<sup>e</sup>, Thierry Leroy<sup>a</sup>, Patricia Roeckel-Drevet<sup>b</sup> and Valérie Pujade-Renaud<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand Cedex, France

<sup>c</sup> CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

<sup>d</sup> CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

<sup>e</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Pr; CPP 8702-900, Brazil

<sup>f</sup> Biotechnology Unit, RRIM Research Station, 47000 Sungai Buloh, Selangor D.E., Malaysia

### Abstract

The Ascomycota fungus *Corynespora cassiicola* is causing diseases in many host plants in tropical and subtropical areas. In rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *C. cassiicola* is the causative agent of the Corynespora Leaf Fall (CLF), one of the most important cryptogamic diseases of this economically important tree in Asia and Africa. An important effector potentially involved in CLF was previously identified as a small secreted cystein-rich glycoprotein so called cassiicolin. The cassiicolin-encoding gene (*Cas1*) was characterized and shown to be expressed in the early phase of infection. In the present study, we evidenced the important and structured diversity of the cassiicolin-encoding gene, in *C. cassiicola* isolates sampled on a large collection of host plants from various geographical origins. Up to six different cassiicolin isoforms were identified. We also demonstrated for the first time that two cassiicolin gene variants encoding different cassiicolin isoforms can co-exist in the same isolate. Globally, the phylogenetic trees based on either the *Cas* gene sequences or combined neutral genes were congruent. A strongly supported rubber tree-specialized clade encompassing all the isolates carrying the *Cas1*-encoding gene was evidenced. The isolates from this group were found the more aggressive, when inoculated on two rubber tree cultivars, among a selection of isolates corresponding to the different genetic groups. Other rubber tree-specialized clades were found, encompassing isolates in which no *Cas* gene could be detected although they could generate mild symptoms on rubber tree. They may correspond to different races, interacting with their hosts through yet unidentified disease effectors.

## Introduction

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A; Curtis) C. T. Wei is an Ascomycota anamorphic fungus found on leaves, stems, flowers, fruits and roots of more than 300 plant species (Farr and Rossman 2011). This fungus is a major plant pathogen causing significant economic losses in many countries on plants of economic importance such as rubber tree, tomato, cucumber, soybean, cotton and more. Its trophic capabilities are multiple: it has been isolated in most cases from symptomatic plant material and thus classified as pathogenous, but also occasionally from decaying organic material (Kingsland 1985b; Lee et al. 2004; Cai et al. 2006) or living non symptomatic tissues (Collado et al. 1999; Suryanarayanan et al. 2002; Gond et al. 2007; Promputtha et al. 2007) and thus classified as saprophyte or endophyte, respectively.

In rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *C. cassiicola* causes the damaging Corynespora Leaf Fall (CLF) disease which affects all Asian and African rubber producing countries. Up to now, *C. cassiicola* was considered as a necrotrophic pathogen, but recently Déon et al (2012b) found endophytic isolates on cultivated rubber trees in Brazil.

*C. cassiicola* pathogenicity in rubber tree is mediated by a small phytotoxic protein named cassiicolin which was first purified from the culture filtrate of a pathogenous isolate from a rubber plantation in Philippines (CCP) (Breton et al. 2000; Barthe et al. 2007; de Lamotte et al. 2007; Déon et al. 2012a). This 27 amino acids glycosylated protein is matured from a precursor protein (Cas1) leaded by a signal peptide involved in secretion (Déon et al. 2012a). The gene encoding the cassiicolin precursor (Cas1, EF667973) is transiently expressed one or two days after inoculation, suggesting a role in the early phase of infection (Déon et al. 2012a). Homologues of the cassiicolin gene were subsequently discovered in other *C. cassiicola* isolates from rubber tree: the CT1 gene (renamed Cas2 by Déon et al (2012a)) was identified in a Chinese pathogenous isolate (GU373809, unpublished); the Cas3 and Cas4 genes were discovered in Brazilian endophytic isolates (Déon et al. 2012b). Unlike Cas1, Cas3 and 4 were not expressed after inoculation of the corresponding isolates on detached rubber tree leaves (Déon et al. 2012b).

Genetic studies of *C. cassiicola* isolates from rubber trees using RAPD, rDNA-RFLP or ISSR markers revealed an important diversity among isolates and specific clades (Darmono et al. 1996; Silva et al. 1998; Saha et al. 2000; Silva et al. 2003; Romruensukharom et al. 2005; Nghia et al. 2008; Qi et al. 2009). However, until now there is no clear concordance between the genetic clades and the features of the isolates, e.g. morphology, pathogenicity, geographical origin or rubber cultivars from which the strains were isolated.

Two races of *C. cassiicola* from Malaysia with distinct cultivar host preferences could be genetically differentiated using combined RAPD and rDNA-RFLP markers (Atan and Hamid 2003) or ISSR (Nghia et al. 2008). Qi et al (2009) did not find any relation between genetic clades identified using ISSR and the pathogenicity, geographical origin or race structure of 24 isolates from rubber tree in China. However, they could find more recently a concordance with the host of origin when working on a set of 22 isolates from various plants (Qi et al. 2011).

A larger phylogenetic analysis based on four genes sequencing was conducted on 135 *C. cassiicola* isolates, collected from many host plants in seven geographical locations (Dixon et al. 2009). This analysis delineated six phylogenetic clades which were found in relative concordance with the host of origin, the pathogenicity profile and the growth rate, but not with their geographical location of sampling. One of the genetic clades was host plant-specialized, whereas the others had a wider range of host plants.

In rubber tree, cultivars considered resistant to CLF in some countries were described susceptible in others. This suggested some diversity in the populations of *C. cassiicola*, with the possible existence of distinct races differing in their cultivar preferences (Saha et al. 2000; Silva et al. 2003; Atan and Hamid 2003; Romruensukharom et al. 2005; Nghia et al. 2008). Whether the diversity in pathogenicity features (virulence vs avirulence, aggressiveness, host or cultivar preferences...) can be explained by differences in disease effectors such as cassiicolin was so far largely unknown.

The purpose of this study was to 1) investigate the diversity of the cassiicolin-encoding gene (*Cas*) of *C. cassiicola* isolates from various hosts and various geographical origins, 2) evaluate their genetic structure based on neutral molecular markers to analyse their evolutionary history, and 3) relate the *Cas* gene diversity to the genetic structure and pathogenicity features, with a special emphasis on the isolates from rubber tree.

## Materials and Methods

### Biological material

*C. cassiicola* isolates used in this study (Table 1) were sampled from various locations representing their geographical distribution range (Africa, Asia, and Latin America) and from most of their known host plants (*Hevea brasiliensis*, *Carica papaya*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Hibiscus esculentus*, *Hydrangea macrophylla*, *Lycopersicon esculentum* and *Piper hispidinervum*). All isolates were obtained from lesioned tissue except five isolates obtained from asymptomatic *H. brasiliensis* leaves (Déon et al. 2012b). All isolates were purified by single-conidium isolation and identified as *C. cassiicola* isolates by sequencing of PCR-amplified fragments of the ribosomal genes using primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990).

The mycelium was cultivated on PDA medium (Potato Dextrose Agar, DIFCO) at 25°C (photoperiod 12/12), collected, frozen in liquid nitrogen and lyophilised. The genomic DNA was extracted as described previously (Risterucci et al. 2000).

The rubber tree cultivars used for the inoculation (cultivars RRIM 600 and PB217) were cultivated in a greenhouse in Clermont-Ferrand (France) at 28°C ± 2°C with 80% relative humidity. All the cultivars were grafted clones.



**Table 1:** Origin and characteristics of *Corynespora* isolates used in the phylogenetic analyses.

Isolate code <sup>a</sup>	Isolate name <sup>b</sup>	Geographic origin	Host <sup>c</sup>	Host tissue <sup>d</sup>	Cas gene <sup>e</sup>	Dixon PL <sup>f</sup>	Final PL <sup>g</sup>
1-PH-Hb	CCP	Philippines (PH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
2-CA-Hb	CCAM1	Cameroon (CA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL5
3-CA-Hb	CCAM2	Cameroon (CA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
4-CA-Hb	CCAM3	Cameroon (CA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
5-CA-Hb	CCAM4	Cameroon (CA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL5
6-CA-Hb	CCAM5	Cameroon (CA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
7-GA-Hb	CGAB1	Gabon (GA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.6
8-GA-Hb	CGAB2	Gabon (GA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.6
9-GA-Hb	CGAB3	Gabon (GA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.6
10-IN-Hb	CIND2	India (IN)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
11-IN-Hb	CIND3	India (IN)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
12-IN-Hb	CIND4	India (IN)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
13-IN-Hb	CIND5	India (IN)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
14-IN-Hb	CIND6	India (IN)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
15-SL-Hb	CSRI3	Sri Lanka (SL)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
16-SL-Hb	CSRI4	Sri Lanka (SL)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
17-SL-Hb	CSRI5	Sri Lanka (SL)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
18-TH-Hb	CTHA2	Thailand (TH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL2.1
19-TH-Hb	CTHA3	Thailand (TH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL3.4
20-TH-Hb	CTHA4	Thailand (TH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL3.4
21-TH-Hb	CTHA6	Thailand (TH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1
22-MA-Hb	CSB1	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas5	Untested	PL2.1
23-MA-Hb	CSB16 R1	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas5	Untested	PL2.1
24-MA-Hb	TSB1	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas5	Untested	PL2.1
25-MA-Hb	CLS1	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
26-MA-Hb	SS1	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas5	Untested	PL2.1
27-MA-Hb	CLN16 R2	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.2
28-GH-Hb	CGHA1	Ghana (GH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
29-GH-Hb	CGHA2	Ghana (GH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
30-GH-Hb	CGHA3	Ghana (GH)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas1	Untested	PL7
31-BR-Hb	E55	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas0	Untested	PL4
32-BR-Hb	E70	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas3	Untested	-
33-BR-Hb	E78	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas3	Untested	PL4
34-BR-Hb	E79	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas4	Untested	PL5
35-BR-Hb	E137	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas0	Untested	PL5
36-BR-Hb	E139	Brazil (BR)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Healthy	Cas4	Untested	PL5
37-BR-Cp	DOA16B	Brazil (BR)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1
38-BR-Cp	CABI335303	Jamaïque (JA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1
39-BR-Cs	EDIG	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1
40-BR-Cs	1030	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
41-BR-Cs	CMENY	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
42-BR-Cs	JQ	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas0	Untested	PL1.7
43-BR-Cs	CBS129.25	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
44-BR-Cs	PB	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
45-BR-Cs	IA	Brazil (BR)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
46-BR-Gm	ATI13	Brazil (BR)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Lesioned	Cas2 + 6	Untested	PL1

Table 1 (continued)

Isolate code <sup>a</sup>	Isolate name <sup>b</sup>	Geographical origin	Host <sup>c</sup>	Host tissue <sup>d</sup>	Cas gene <sup>e</sup>	Dixon PL <sup>f</sup>	Final PL <sup>g</sup>
47-BR-Gm	777AA	Brazil (BR)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
48-BR-Gm	RUD	Brazil (BR)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Lesioned	Cas2 + 6	Untested	PL1.7
49-BR-Gm	493AA	Brazil (BR)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Lesioned	Cas2	Untested	PL1.7
50-IN-He	CABI132039	India (IN)	<i>Hibiscus esculentus</i> (He)	Lesioned	Cas0	Untested	PL2
51-BR-Hm	ATI12	Brazil (BR)	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Hm)	Lesioned	Cas0	Untested	PL7
52-BR-Hm	CP13	Brazil (BR)	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Hm)	Lesioned	Cas0	Untested	-
53-BR-Le	MPA	Brazil (BR)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Le)	Lesioned	Cas0	Untested	PL4
54-BR-Le	1414	Brazil (BR)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Le)	Lesioned	Cas0	Untested	PL4
55-BR-Le	LPO2	Brazil (BR)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Le)	Lesioned	Cas0	Untested	PL4
56-BR-Le	GSO4	Brazil (BR)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Le)	Lesioned	Cas0	Untested	PL4
57-BR-Ph	LPO7	Brazil (BR)	<i>Piper hispidinervum</i> (Ph)	Lesioned	Cas0	Untested	PL4
D1-MA-Hb	MY CBPP	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Untested*	1.2	PL1.2
D2-MA-Hb	MY CLN16	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Untested*	1.2	PL1.2
D3-MA-Hb	MY CSB12	Malaysia (MA)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Untested*	2	PL2
D4-GU-Ac	GU38	Guam (GU)	<i>Allamanda cathartica</i> (Ac)	Lesioned	Untested	2	PL2
D5-SA-Ag	SN64	Saipan (SA)	<i>Asystasia gangetica</i> (Ag)	Lesioned	Untested	5.1	PL5
D6-GU-Ba	GU42	Guam (GU)	<i>Bidens alba</i> (Ba) <i>Calopogonium mucunoides</i> (Cm)	Lesioned	Untested	1	PL1
D7-GU-Cm	GU55	Guam (GU)	<i>Calopogonium mucunoides</i> (Cm)	Lesioned	Untested	3.2	PL3.2
D8-GU-Ca	GU93	Guam (GU)	<i>Capsicum annum</i> (Ca)	Healthy	Untested	1.3	PL1
D9-GU-Cp	GU92	Guam (GU)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D10-PA-Cp	PW01	Palau (PA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D11-PA-Cp	PW12	Palau (PA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D12-PA-Cp	PW37	Palau (PA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D13-SA-Cp	SN07	Saipan (SA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Healthy	Untested	1.1	PL1
D14-SA-Cp	SN18	Saipan (SA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D15-YA-Cp	YP01	Yap (YA)	<i>Carica papaya</i> (Cp)	Lesioned	Untested	1.1	PL1
D16-AS-Cp	AS117	American Samoa (AS)	<i>Carica papaya</i> fruit (Cp)	Necrotic	Untested	3.2	PL3.2
D17-FL-Cr	FL36	Florida (FL)	<i>Catharanthus roseus</i> (Cr)	Lesioned	Untested	2	PL2
D18-PA-Cr	PW92	Palau (PA)	<i>Catharanthus roseus</i> (Cr)	Lesioned	Untested	1.3	PL1
D19-SA-Cg	SN48	Saipan (SA)	<i>Coccinia grandis</i> (Cg)	Healthy	Untested	3.3	PL3
D20-GU-Cv	GU10	Guam (GU)	<i>Codiaeum variegatum</i> (Cv)	Healthy	Untested	1.3	PL1
D21-AS-Cs	AS92	American Samoa (AS)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	4	PL4
D22-AS-Cs	AS98	American Samoa (AS)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	1	PL1
D23-PA-Cs	PW87	Palau (PA)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	1	PL1
D24-SA-Cs	SN40	Saipan (SA)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	4	PL4
D25-YA-Cs	YP26	Yap (YA)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	1	PL1
D26-YA-Cs	YP27	Yap (YA)	<i>Cucumis sativus</i> (Cs)	Lesioned	Untested	2	PL2
D27-AS-Cpe	AS119	American Samoa (AS)	<i>Cucurbita pepo</i> (Cpe)	Lesioned	Untested	3.2	PL3.2
D28-AS-Cpe	AS71	American Samoa (AS)	<i>Cucurbita pepo</i> (Cpe)	Lesioned	Untested	1	PL1
D29-GU-Eh	GU83	Guam (GU)	<i>Euphorbia heterophylla</i> (Eh)	Healthy	Untested	4.1	PL4.1
D30-GU-Em	GU101	Guam (GU)	<i>Euphorbia milii</i> (Em)	Lesioned	Untested	4	PL4
D31-BR-Gm	BZ JMP218	Brazil (BR)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Lesioned	Untested	1	PL1
D32-GU-Gm	GU112	Guam (GU)	<i>Glycine max</i> (Gm)	Healthy	Untested	3.3	PL3
D33-YA-Ib	YP59	Yap (YA)	<i>Ipomoea batatas</i> (Ib)	Healthy	Untested	2	PL2
D34-GU-Jc	GU44	Guam (GU)	<i>Jatropha curcas</i> (Jc)	Healthy	Untested	4.1	PL4.1
D35-BR-Lc	BZ JMP216a	Brazil (BR)	<i>Lantana camara</i> (Lc)	Lesioned	Untested	4	PL4
D36-FL-Lc	FL09	Florida (FL)	<i>Lantana camara</i> (Lc)	Lesioned	Untested	4	PL4
D37-GU-Lc	GU08	Guam (GU)	<i>Lantana camara</i> (Lc)	Lesioned	Untested	1	PL1
D38-SA-Lc	SN59	Saipan (SA)	<i>Lantana camara</i> (Lc)	Lesioned	Untested	1.5	-

Table 1 (continued)

Isolate code <sup>a</sup>	Isolate name <sup>b</sup>	Geographic origin	Host <sup>c</sup>	Host tissue <sup>d</sup>	Cas gene <sup>e</sup>	Dixon PL <sup>f</sup>	Final PL <sup>g</sup>
D39-SA-La	SN06	Saipan (SA)	<i>Luffa acutangula</i> (La)	Healthy	Untested	3.2	PL3.2
D40-GU-Ma	GU104	Guam (GU)	<i>Macroptilium atropurpureum</i> (Ma)	Lesioned	Untested	1.3	PL1
D41-GU-Me	GU111	Guam (GU)	<i>Manihot esculenta</i> (Me)	Healthy	Untested	4.1	PL4.1
D42-AS-Ob	AS80	American Samoa (AS)	<i>Ocimum basilicum</i> (Ob)	Lesioned	Untested	3.2	PL3.2
D43-SA-PI	SN69	Saipan (SA)	<i>Pachystachys lutea</i> (PI)	Lesioned	Untested	3.1	PL3
D44-GU-Pf	GU65	Guam (GU)	<i>Passiflora foetida</i> (Pf)	Healthy	Untested	3.3	PL3
D45-PA-Pm	PW79	Palau (PA)	<i>Pilea microphylla</i> (Pm)	Lesioned	Untested	2	PL2
D46-GU-Pn	GU103	Guam (GU)	<i>Pilea nummulariifolia</i> (Pn)	Healthy	Untested	2	PL2
D47-PA-Pbe	PW69	Palau (PA)	<i>Piper betle</i> (Pbe)	Healthy	Untested	2	PL2
D48-BR-Pb	BZ RWB321	Brazil (BR)	<i>Plectranthus barbatus</i> (Pb)	Lesioned	Untested	5	PL5
D49-FL-Pb	FL62	Florida (FL)	<i>Plectranthus barbatus</i> (Pb)	Lesioned	Untested	1	PL1
D50-GU-Si	GU99	Guam (GU)	<i>Saintpaulia ionantha</i> (Si)	Lesioned	Untested	6	PL6
D51-SA-Si	SN43	Saipan (SA)	<i>Saintpaulia ionantha</i> (Si)	Lesioned	Untested	3	PL3
D52-TE-Si	TN13-3	Tennessee (TE)	<i>Saintpaulia ionantha</i> (Si)	Lesioned	Untested	6	PL6
D53-YA-Si	YP41	Yap (YA)	<i>Saintpaulia ionantha</i> (Si)	Lesioned	Untested	2	PL2
D54-AS-Si	AS49	American Samoa (AS)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Si)	Lesioned	Untested	3.1	PL3
D55-AS-Si	AS50	American Samoa (AS)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Si)	Lesioned	Untested	3	PL3
D56-GU-Si	GU28	Guam (GU)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Si)	Lesioned	Untested	4	PL4
D57-YA-Si	YP42	Yap (YA)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Si)	Lesioned	Untested	3	PL3
D58-AS-Sm	AS65	American Samoa (AS)	<i>Solanum melongena</i> (Sm)	Necrotic	Untested	4.1	PL4.1
D59-GU-Sm	GU70	Guam (GU)	<i>Solanum melongena</i> (Sm)	Healthy	Untested	1.4	PL1
D60-GU-Ti	GU114	Guam (GU)	<i>Teramnus labialis</i> (Ti)	Healthy	Untested	3.1	PL3
D61-AS-Vu	AS58	American Samoa (AS)	<i>Vigna unguiculata</i> (Vu)	Lesioned	Untested	1.3	PL1
D62-PA-Vu	PW101	Palau (PA)	<i>Vigna unguiculata</i> (Vu)	Lesioned	Untested	5	-
D63-UK-Fs*	IMI5649b	United Kingdom (UK)	<i>Fagus sylvatica</i> (Fs)	Lesioned	Untested	O	O
D64-NZ-Pt*	IMI211585	New Zealand (NZ)	<i>Poncirus trifoliatus</i> (Pt)	Healthy	Untested	O	O
	Cc004	China	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	Lesioned	Cas2	Untested	Untested

All isolates are *Corynespora cassiicola* except two which appertain to *smithii* and *citricola* species and are noted by \*.

(a) A code was attributed for each isolate containing the geographic origin and the isolation host.

(b) The original name of isolates.

(c) Original host from which the isolate was collected.

(d) Description of host tissue prior to strain isolation.

(e) Results of the Cassiicolin PCR detection.

(f) Phylogenetic lineages obtained in Dixon et al (2009) based on combined sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer region, *caa5*, *ga4*, and *act1*. Two isolates were defined as outgroups (O); – indicates that the isolate's clade was not statistically significant.

(g) Phylogenetic lineages obtained in our study based on combined sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer region, *caa5* and *ga4*. When it was possible, the same PL as Dixon analysis were conserved.

Property of isolates used in this study: CIRAD collection: isolates 1 to 36, 38, 43 and 50.

Maringa University collection: isolates 37, 39 to 42, 44 to 49, 51 to 57.

Dixon et al (2009) collection: isolates D1 to D64.

### Detection and sequencing of the Cassiicolin-encoding genes

Detection of the cassiicolin gene homologues was conducted by PCR on genomic DNA from all *C. cassiicola* isolates. Primers covering all available Cas sequences were designed (see table 2 for primer sequence details). The first set of primers (CasF9, CasF11, CasF12 and CasF18; CasR16, CasR19, CasR20 and CasR27) was designed from the reference sequence *Cas1* (EF667973; (Déon et al. 2012a)). The second set of primers (CT1F9, CasF14 and CasF17; CT1R16, CasR22 and CasR24) was designed from the CT1 (*alias* *Cas2*) sequence (GU373809; unpublished). The last set of primers (CasF15 and CasF20; CasR28) was designed from the *Cas3* and *Cas4* sequences (JF915169 to JF915172 ;(Déon et al. 2012b)). All primer combinations were tested. PCR was performed on 100 ng of *C. cassiicola* genomic DNA in a 50 µl reaction mix containing 0.2 µM of forward and reverse primers, 200 µM of the dNTP mix, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1x buffer and 1 u of Taq DNA polymerase (Qbiogen, Illkirch, France) in a Bio-Rad thermocycleur. All PCR products were sequenced by GATC-Biotech and aligned using the Geneious Pro program (Drummond et al. 2011).

Some of the PCR products obtained were identical or highly homologous to the previously described *Cas1*, *Cas2*, *Cas3* or *Cas4* genes. In that case, PCR amplification was repeated using AccuPrime™ Pfx proofreading DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK), with the following primer pairs allowing for amplification of the full length sequence: CasF18/CasR27 (*Cas1*), CasF17/CasR24 (*CT1 alias Cas2*), CasF20/CasR28 (*Cas3* and *Cas4*). PCR were performed on 100 ng of *C. cassiicola* in a 50 µl reaction mix as described above according to the manufacturer's recommendations. All of the primers used in this study are listed in the table 2.

When direct amplification of the full length sequence was not possible, the Genome Walking technique was used to get the 5' and 3' flanking sequences of the gene fragments, as described previously (Déon et al. 2012b). This allowed the amplification of two new cassiicolin-encoding genes, *Cas5* and *Cas6*, described here after.

The *Cas5* full length sequence was obtained from isolate 22-MAHb. Specific primers (CasW-CSB-R01 and CasW-CSB-F01) were designed from the partial sequence obtained using the CasF11/CasR19 primers pair. To get the 5' flanking region of *Cas5*, two successive nested PCR were performed using primers AP1/CasR19 and AP2/CasW-CSB-R01 for PCR1 and PCR2 respectively. To get the 3' flanking region of *Cas5*, the primers AP1/CasF11 and AP2/CasW-CSB-F01 were used for PCR1 and PCR2, respectively.

The *Cas6* full length sequence was obtained from isolate 48-BRGm. Specific primers (CasW-RUD-R01 and CasW-RUD-F02) were designed from the partial sequence obtained using the CasF11/CasR19 primers pair. To get the 5' flanking region of *Cas6*, the primers AP1/CasR16 and AP2/CasW-RUD-R01 were used for PCR1 and PCR2 respectively. To get the 3' flanking region of *Cas5*, the primers AP1/CasF11 and AP2/CasW-RUD-F02 were used for PCR1 and PCR2 respectively.

**Table 2:** Primers Table

Primers names	Sequences (5'.....3')
CT1-F9	ATCAGTTCGAAATCTTTGAGACCTGTCC
CasF9	ATCAATTCCAAATCTTGAAAATCTGTCC
CasF11	GTAAGCTGTGTCAATTTTCGGC
CasF12	GTAAGCTGTGTCAATTTTCGGC
CasF14	CGGCAGCAGCTATTCTTC
CasF15	CCTTTGCTCCCTAGACAGT
CasF16	GCTTGATTTGCCTGTGAGATACT
CasF17	GGATTTGCCTGAGATCCTA
CasF18	CCCAAGATACATGTTTTGAATGT
CasF19	CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA
CasF20	GTCGGCTAACTTGGGAAAACTCT
CT1R16	GGATCCGTAAGAATATAAATTTGTGTATG
CasR16	GGATCCGTAAGAGTATAAATTTGTGTATG
CasR19	TGTTCCGGATGTTAACTTTGG
CasR20	AGCCCAAGAATTACCACAGTT
CasR22	GAAGAATAGCTGCTGCCG
CasR24	CAAACAATGCTAACCACAAACAAAC
CasR25	AAAACGATGCTAAACAAAAGGA
CasR26	CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC
CasR27	CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC
CasR28	GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC
CasW-CSB-F01	GTATCATGTGTCAATTTTCGGC
CasW-CSB-F03	GACAACTGTGGCAATTCCTGGGC
CasW-CSB-R01	CGAACTGTATGCACATTAGC
CasW-CSB-R02	CATTAGCTTTAGATTTGAGAAACAG
CasW-RUD-F02	ATACGCAAGTCTCTTGCTCCTGAGT
CasW-RUD-F03	CTTGCTCCTGAGTCATCTAGATCGA
CasW-RUD-R01	CAGCCCAAGAATCACCAGTACAAGTG
CasW-RUD-R03	CCATTGCCAAAGTATTCACAAAAAGCC
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
GA4F	CCTGCTCCGACTTTGTTGAG
GA4R	GTCTGGGAGCAGCAAAGACT
CAA5F	GTCCACAAGTGGAACCTCGT
CAA5R	CCTCGTCTGCCAGTTCTTCT

PCR reactions were performed in 1x buffer containing 1,5 mM of  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  of dNTPs, 200 nM of the adaptor, 0,2  $\mu M$  of the Cas-specific primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Eurobio, Courtaboeuf, France). All PCRs were conducted under the following conditions: an initial denaturation step (4 min at 95°C), then 40 cycles (30 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, 2 min at 72°C) and a final extension step (72°C for 5 min). PCR products migrating as a single unique band after electrophoresis on an agarose gel were directly sequenced using nested Cas5- and Cas6-specific primers: CasW-CSB-R02 and CasW-CSB-F03 for Cas5 5' and 3' flanking regions respectively; CasW-RUD-R03 and CasW-RUD-F03 for Cas6 5' and 3' flanking regions respectively. New sets of primers were designed from both ends of the 5' and 3' flanking sequences and used to amplify the complete Cas5 and Cas6 sequences (CasF19/CasR26 for Cas5 and CasF16/CasR25 for Cas6) using the AccuPrime™ Pfx proofreading DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's recommendations. Primers used are listed in the table 2.

Homology searches were performed using the BLAST program in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The prediction of the signal peptide in the protein was performed using SignalP software, version 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al. 2004). The program TMHMM, version 2.0, was used to check for the presence of transmembrane spanning regions in the protein (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). The ProtComp program (version 9.0; <http://www.softberry.com>) was used to confirm the subcellular localization of the protein.

## Phylogenetic analyses

### *Phylogenetic analysis of the cassiicolin gene*

The sequences were aligned and corrected using MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Phylogenetic trees of cassiicolin genes were realized with the Maximum Parsimony (MP), Neighbor joining (NJ) and Maximum likelihood (ML) method using Paup 4.0b10 (Swofford 2000) and PaupUp graphical interface (Calendini and Martin 2005). The analysis involved 28 nucleotide sequences, 27 from our isolates and one (*CT1*) from NCBI database (GU373809, unpublished). All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 569 positions in the final dataset analyzed. MP analyses using a heuristic search with random stepwise addition of taxa (10 replicates), TBR branchswapping, and MULPARS options. Only informative sites equally weighted were considered. Consistency index (CI) was calculated in order to evaluate dataset homoplasy. Neighbor joining (NJ) was performed using the Kimura-2-parameter model. The best-fit evolutionary model for Maximum likelihood (ML) analyses, selected using Modeltest 3.6 program through PaupUp graphical interface, was TrN+I. The robustness of nodes was assessed with 1000 bootstrap (BS) replicates. The congruence between the different phylogenetic topology obtained in order to display only one tree topology was assessed under likelihood using Shimodaira-Hasegawa significance test (1999) with real bootstrap and 1000 simulations.

*Phylogenetic analysis based on neutral markers*

Three loci (rDNA ITS, *caa5* and *ga4*) from the 57 isolates of our collection, including 36 samples from *Hevea brasiliensis*, were sequenced, using primers ITS1/ITS4 for the ITS1 and ITS2 regions including the 5.8S rDNA coding region, GA4-F/GA4-R and CAA5-F/CAA5-R for the random hypervariable *ga4* and *caa5* loci (table 1). The primers and PCR conditions were previously described in Dixon *et al* (2009) on *Corynespora spp.* PCR products were sequenced by GATC biotech. Sixty four isolates from Dixon's study representing different Phylogenetic Lineages (PL) were added to the analysis from NCBI database extraction. *C. smithii* IMI 5649b and *C. citricola* IMI 211585 were selected as outgroups for rooting purposes. Phylogenetic trees were performed on the three loci concatenated as previously described by Dixon *et al* (2009) on *Corynespora spp.* Phylogenetic analyses were made using the above described methods for the cassiicolin gene analysis. The analysis involved 121 nucleotide sequences. The analyses were performed on a total of 1132 characters amplified from the three concatenate ITS, *ga4* and *caa5* loci. A 204 steps long consensus tree was obtained using Parsimony analysis (CI = 0.5931, RI = 0.9401 and RC = 0.5576). The maximum-likelihood method was based on the most appropriate model of substitution, TrN model of substitution plus invariable sites (I), determined by hierarchical likelihood ratio tests. Model parameters are as follows: I = 0.8245, Ti/tv = 3.6246; base frequencies, A = 0.23330, C = 0.34120, G = 0.22930 and T = 0.19620.

The topologies obtained with Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Neighbor-Joining methods were compared using the Shimodaira–Hasegawa test (Shimodaira and Hasegawa 1999) based on likelihood-ratio tests. It does not provide support for significant differences between the trees ( $P > 0.05$ ), hence we only display the phylogenetic reconstruction obtained from MP.

**Pathogenicity tests**

For the pathogenicity analysis, we selected 16 isolates carrying genes encoding the different cassiicolin precursors isoforms (Cas1 to Cas6) as well as isolates in which no Cas gene could be identified (Cas0) (table 1). The selected isolates were tested on two rubber tree cultivars previously shown to be susceptible (PB 217) and tolerant (RRIM 600) to three isolates of contrasted aggressiveness (Déon *et al.* 2012a). In addition, RRIM 600 was previously described as a discriminant cultivar allowing the classification of some *C. cassiicola* isolates from Malaysia and China into two races, based on their cultivar preferences (Nghia *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009).

The *C. cassiicola* isolates were cultivated on PDA medium (Difco™) at 25°C (photoperiod: 12 h). The conidia were collected and resuspended in sterile water supplemented with 0.02% Tween20 at a concentration of 5000 conidia/ml. In total, 10 drops of each conidia suspension (20 µl) were applied to the abaxial surface of six detached rubber tree leaflets in developmental stage C (brownish to limp green) (Hallé and Martin 1968a) of two rubber tree cultivars (RRIM 600 and PB 217). The leaflets were maintained in a moist environment at 25°C for 24 h in the dark and then under alternate light (photoperiod 12 h). The drops were evaporated four days post-inoculation (dpi).

The symptom intensity (SI) was scored nine days after spore inoculation. For each drop, five levels of damage were distinguished: 0, no symptom; 1, pinpoint necrosis; 2, coalescent necrotic spots covering less than 50% of the drop surface; 3, the necrosis surface represents 50% to 100% of the drop surface; 4, the necrosis surface represents 100% to 200% of the drop surface; 5, the necrosis surface represents more than 200% of the drop surface. A Severity Index per leave ( $SI_L$ ) was calculated as follows (kx being the number of spots in class x):

$$SI_L = k_1 + (2k_2) + (3k_3) + (4k_4) + (5k_5)$$

For each isolate/cultivar couple, the final SI value was the mean of all  $SI_L$  for at least 3 biological replicates. Analyses of variance (ANOVA) were performed with R software, version 2.10.1 (R\_Development\_Core\_Team 2009) and differences between means were tested using Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test ( $P < 0.05$ ).



Cas1: MKYL**PILISAFVAAV**AAAPQDPSAV-APVLPRQ**TCVSCVNFGNGFCGDNC**-GNSWACSGC  
 Cas2: MKYL**PIFISAFVAAV**AVPQ**G**PSAAAA**IL**PRQ**SCVSCVD**FGNGFCGDNC-GNSWACSGC  
 Cas3: MKYL**PILISAFVAAIT**AAPQDPSAV-AP**L**PRQ**SCVSCVNFGNGFCGDNC**-GNSWACSGC  
 Cas4: MKYL**PILISAFVAAV**TAAAPQDPSAV-AP**L**PRQ**SCVSCVNFGNGFCGDNC**-GNSWACSGC  
 Cas5: MKYL**PILISAFVAAV**AAAPQDPSAV-AP**L**PRQ**SCVSCVNFGNGFCGDNC**-GNSWACSGC  
 Cas6: MKY**F**PILISAFVAAVAAAPQ**G**PSAVAA**AV**LPRQ**TCAFCEYFGNGYCGNTCTGDS**WAC**SNC**

**Figure 1:** The amino acid sequence alignment of the cassiicolin precursor proteins Cas1 (Genbank, ABV25895), Cas2 (Genbank, ADC54229), Cas3 (Genbank, JF915169 and JF915170), Cas4 (Genbank, JF915171 and JF915172), Cas5 (Genbank, JF915173, JF915174, JF915175 and JF915179) and Cas6 (Genbank, JF915181 and JF915183). The mature cassiicolin domain is indicated by bold letters. The signal peptide is underlined. Amino acid substitutions and insertions, comparatively to the reference sequence Cas1, are colored in grey.

## Results

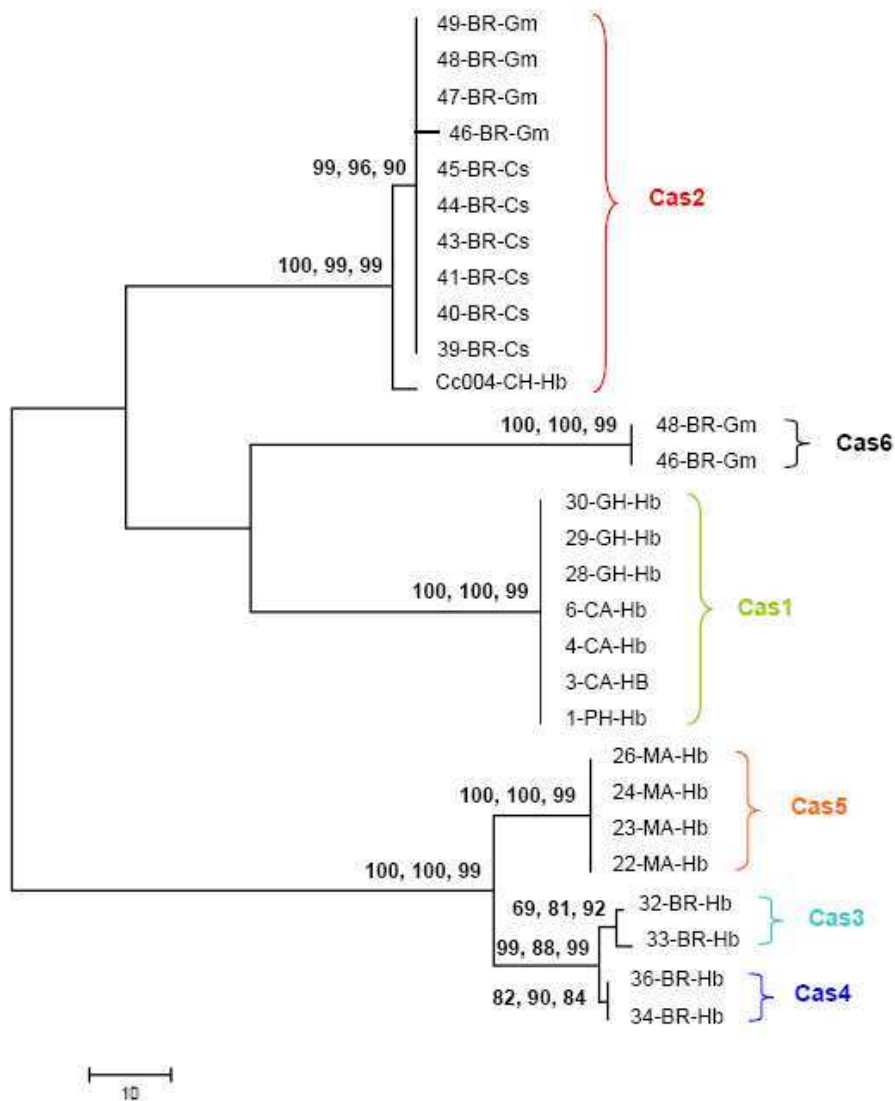
### Detection of cassiicolin gene homologues and comparative analysis of their deduced amino acid sequence

Among the 57 isolates of *C. cassiicola* studied, 25 isolates (42%) had at least one gene encoding a cassiicolin isoform (Table 1). Two isolates, 46 and 48-BR-Gm, carried two distinct genes. An alignment of the predicted amino acid sequences from all Cas gene sequences revealed six cassiicolin precursor isoforms: the Cas1, Cas2, Cas3 and Cas4 isoforms previously described and two new isoforms, Cas5 and Cas6 (Fig. 1). All six Cas sequences have similar structures: a N-terminal domain including a predicted 17 amino acid signal peptide followed by a 14 (15 in case of Cas6) amino acid linker, and a 27 (28 in case of Cas6) amino acid C-terminal domain corresponding to the putative mature cassiicolin domain. Cas5 shares 96% identity (100% positive amino acids) with the reference Cas1 sequence, with only two amino acids substitutions, one in the linker and the other in the predicted mature domain. Cas6 is much more divergent, with only 76% identity (81% positive amino acids), due to 12 substitutions (three in the N-terminal domain and nine in the predicted mature cassiicolin domain) and two insertions (one in the N-terminal domain and one in the predicted mature cassiicolin domain). Cas2 is the second more divergent form compared to Cas1, with 84% identity (89% positive amino acids), as previously described (Déon et al. 2012a).

When comparing the mature cassiicolin domains (Fig. 1 bold letters only), Cas1, 2, 3, 4 and 5 appear very similar to each other, while Cas6 is highly divergent. Cas3, 4 and 5 mature domains are 100% identical to each other and differ from Cas1 mature domain by one positive substitution only (S instead of T). Cas2 mature domain differs from Cas1 mature domain by two substitutions. The three cysteins, engaged in three disulfide bonds in the native Cas1 toxin (Barthe et al. 2007; de Lamotte et al. 2007), are conserved in the mature domain of all other Cas isoforms, including the highly divergent Cas6. This suggests that the three-dimensional structure is probably an important feature for toxin functionality.

### Diversity of the cassiicolin-encoding genes

The cassiicolin-encoding gene diversity was investigated by alignment of the nucleotide sequences and construction of a phylogenetic tree using the Maximum Parsimony method (Fig. 2). The tree shows six groups corresponding to the six cassiicolin precursor isoforms (Cas1 to Cas6). The Cas1 lineage group includes the reference pathogenic isolate CCP (named 1-PH-Hb in this study) sampled from rubber tree in Philippines (Déon et al. 2012a), as well as five other pathogenic isolates from rubber tree sampled in Cameroon (two isolates) and Ghana (three isolates). The Cas2 lineage includes the Cc004 isolate sampled from rubber tree in China (Liu et al, unpublished) in which the first Cas2-encoding gene was discovered (GU373809). This group also includes six pathogenic isolates from *Cucumis sativus* and four from *Glycine max*, all of them from Brazil. The previously described endophytic isolates from rubber tree (Déon et al. 2012b), named E70, E78 and E79, E139 (respectively 32-BRHb, 33-BRHb, 341-BRHb and 36-BRHb in this study), fall in the Cas3 and Cas4 lineage groups.



**Figure 2:** Maximum Parsimony phylogram tree of Cassiicolin precursor genes from *C. cassiicola* isolates sampled on rubber tree, cucumber and soybean from various geographic origins. Bootstrap values (1000 replicates) are provided for each supported branch (>50) respectively for NJ, ML and MP analysis. The MP tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm with search level 1 in which the initial trees were obtained with the random addition of sequences (10 replicates). All the strong Bootstrap values supported clades were noted as NJ, ML and MP.

The Cas5 lineage group includes only pathogenic isolates sampled from rubber tree in Malaysia (four isolates). The Cas6-encoding gene was found in two pathogenic isolates sampled from *Glycine max* in Brazil. Interestingly, these isolates also carry a Cas2-encoding gene. It is the first time that two Cas genes were found in one isolate.

The Cas gene sequences encoding Cas protein precursors Cas3, 4 and 5, which all share the same predicted cassiicolin mature protein domain, are grouped together and appear very distant to the other Cas groups (NJ: 100, ML: 100, MP: 99).

The 23 isolates carrying one Cas gene were assigned to six toxin class (Cas1 to Cas6), based on the encoded protein isoform. The two isolates carrying two genes, encoding the Cas2 and Cas6 isoforms respectively, were assigned to the toxin class Cas2+6. All other isolates (32) were assigned to the toxin class Cas0 as no cassiicolin gene was identified whatever the primers used (Table 1).

### Genetic diversity of the *C. cassiicola* isolates (Fig. 3)

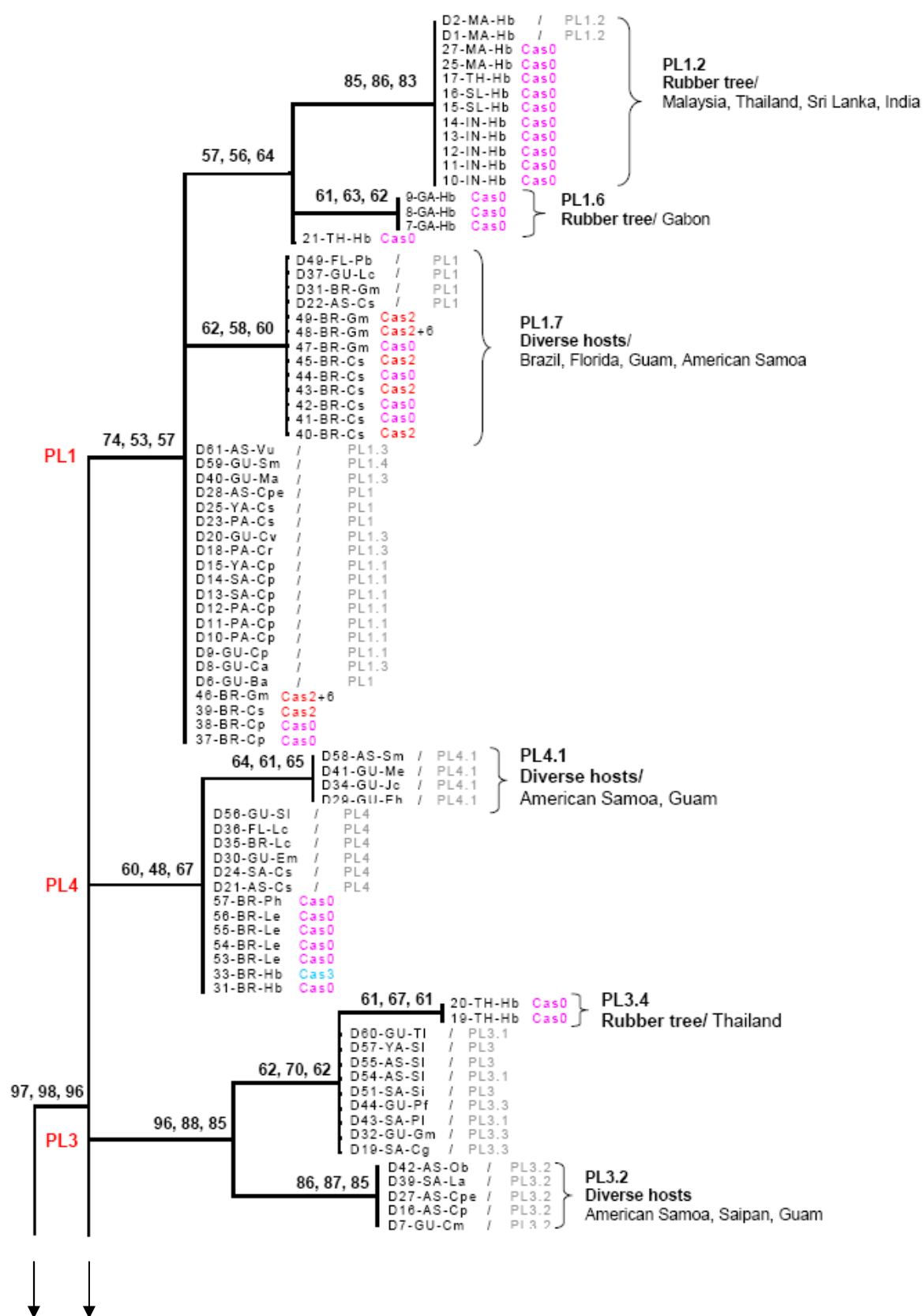
Dixon's PL1 was identified, but it was not strongly supported (NJ: 74, ML: 53, MP: 57). Within this group, distinct clades are observed. Only one of them corresponding to PL1.2 previously identified by Dixon *et al.* is conserved in our analysis and includes twelve isolates sampled on rubber tree collected in Asia (Malaysia, Sri Lanka and India). No cassiicolin gene homologue could be detected in any isolate from this rubber tree clade (Cas0). Our analysis did not allow separating the isolates previously classified into PL1.1, PL1.3, PL1.4 and PL1.5 subgroups in Dixon's study. However, we identified two new clades: PL1.6 which contains three rubber tree isolates from Gabon (Cas0) (NJ: 61, ML: 63, MP: 62) and PL1.7 which contains isolates from diverse hosts and geographic locations (NJ: 62, ML: 58, MP: 60). This PL1.7 includes isolates belonging to the toxin class Cas0, Cas2 and Cas2+6.

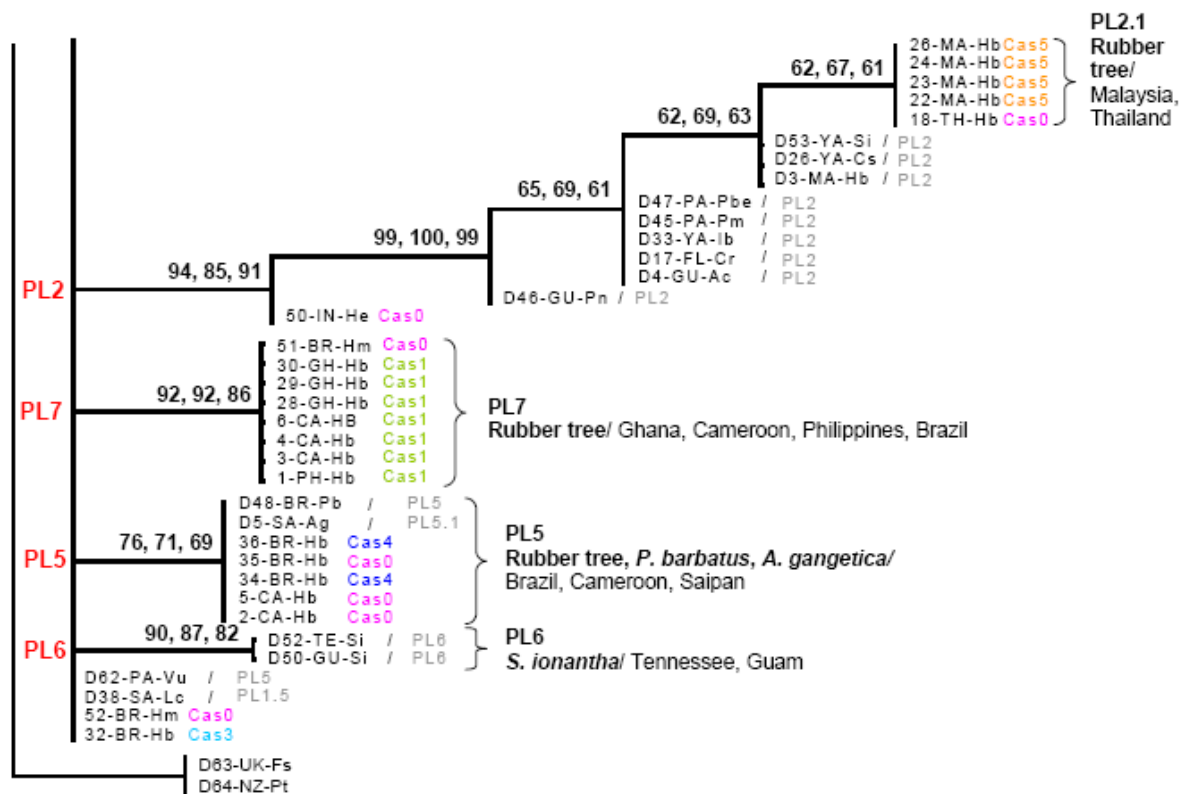
The PL2 clade previously identified by Dixon is also strongly supported in our analysis (NJ: 94, ML: 85, MP: 91). Within PL2, five of our isolates exclusively sampled on *H. brasiliensis* in Malaysia and Thailand form a new clade, PL2.1. All Malaysian isolates of this clade belong to the toxin class Cas5. One Cas0 isolates are also represented.

The PL3 group is represented with high bootstrap values (NJ: 96, ML: 88, MP: 85). The Dixon's PL3.2 clade is conserved and strongly supported (NJ: 86, ML: 87, MP: 85), but the PL3.1, and PL3.3 isolates were not separated. However, a new clade, named PL3.4, was identified, although not strongly supported (NJ: 61, ML: 67, MP: 61). It contains two isolates from our collection collected on *H. brasiliensis* in Thailand. Both isolates belong to the toxin class Cas0.

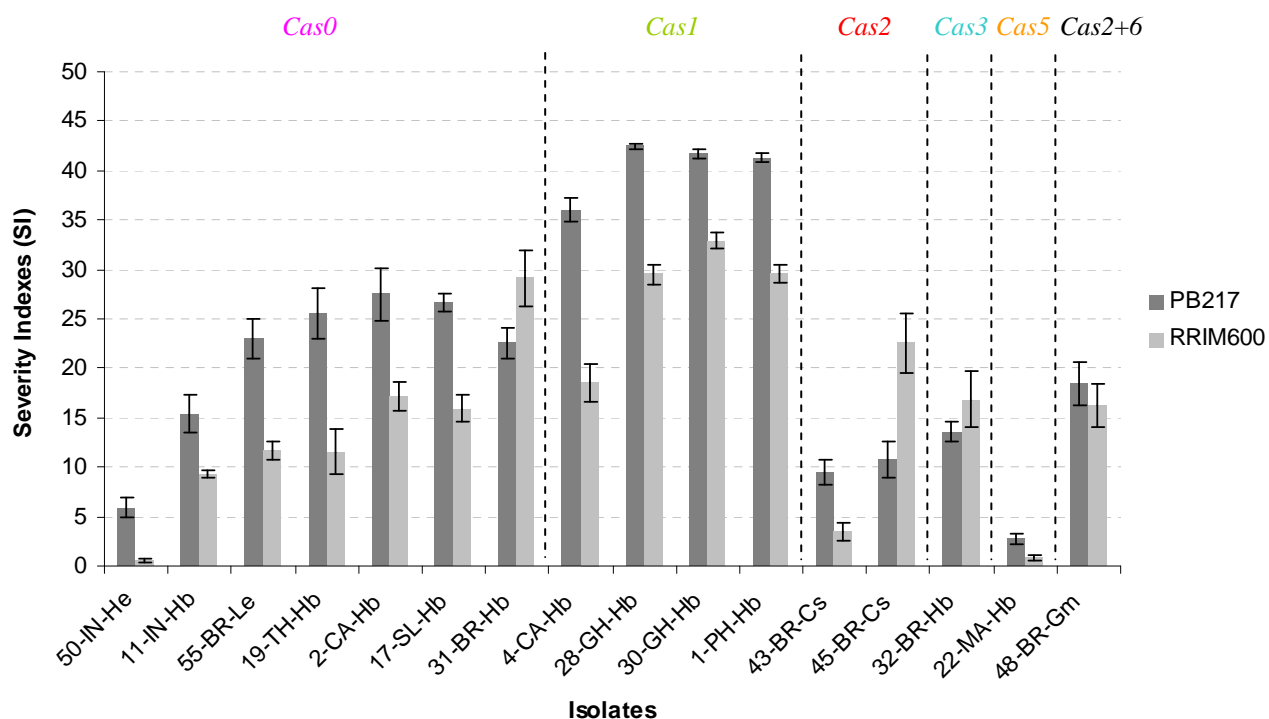
Seven isolates from our collection, collected in Brazil on various hosts (*Lycopersicon esculentum*, *Piper hispidinervum* and *H. brasiliensis*), fell into PL4 (NJ: 60, ML: 48, MP: 67), together with isolates from diverse host and geographical locations, from Dixon's collection. The isolates 31 and 33-BR-Hb originated from asymptomatic rubber tree leaves and belonged to the toxin classes Cas0 and Cas3 respectively. The PL4.1 clade identified by Dixon is conserved in our analysis (NJ: 64, ML: 61, MP: 65).

Figure 3 (continued on the next page)





**Figure 3:** The nucleotide sequence alignment of three loci from *C. cassicola* isolates. The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The bootstrap values obtained from the NJ, ML and MP methods are shown. Results of Cas genes detection are indicated next the isolate code and previous PL identified by the Dixon *et al* (2009) are also indicated in grey next the Cas genes detection. All data of this figure are summarized in the table 1.



**Figure 4:** Pathogenicity of sixteen *C. cassiicola* isolates carrying different cassiicolin genes on two rubber tree cultivars (PB 217 and RRIM 600). Graphic representation of the data from the table3. SI = Severity Indexes recorded nine days after spore inoculation. Avirulence: SI<10. Data were analyzed using ANOVA and Tukey HSD test ( $P < 0, 05$ ).

The PL5 (NL: 76, ML: 71, MP: 69) contains five isolates from *H. brasiliensis*: three endophytes collected in Brazil belonging to the toxin classes Cas0 or Cas4, and two pathogenic isolates from Cameroon, belonging to the toxin class Cas0.

In our analysis, we also included the two isolates from Dixon's PL6 group but none of our isolates fell in the same clade.

Finally, we identified a new PL group very highly supported (NJ: 92, ML: 92, MP: 86), that was named PL7. It includes all pathogenic isolates from *H. brasiliensis* carrying Cas1-encoding genes. These seven isolates were from Cameroon, Ghana and Philippines. PL7 also contains one isolate collected on *Hydrangea macrophylla* in Brazil (isolate 51-BR-Ph).

### **Pathogenicity of different *C. cassiicola* isolates on two rubber tree cultivars**

The pathogenicity tests (Fig. 4) demonstrated that Cas1 isolates were globally the most aggressive, compared to isolates from other toxin classes, on the susceptible PB 217 and the tolerant RRIM 600 cultivars. The 4-CA-Hb isolate (CCAM3) was less aggressive than the other three Cas1 isolates, as previously observed (Déon et al. 2012a), but yet equivalent to the most aggressive isolates from other classes. Among the Cas2 isolates, 43-BRCs (CBS129.25) was found avirulent on both rubber tree cultivars whereas 45-BRCs (IA) was found avirulent on PB 217 and very weakly aggressive on RRIM 600. The Cas3 isolate 32-BRHb (E70), one of the rubber tree endophytes collected in Brazil, was very weakly virulent on both rubber tree cultivars. The Cas5 pathogenic Malaysian isolate from rubber tree, 22-MAHb (CSB1), was avirulent on both rubber tree cultivars. The Cas2+6 pathogenic isolate from soybean, 48-BR-Gm (RUD), was very weakly aggressive on both rubber tree cultivars. Among the Cas0 isolates, diverse behaviours were observed, from avirulence to medium aggressiveness.



Isolates	Cassiicolin isoform	Severity Indexes (SI)				Means SI per isolate	
		PB 217		RRIM 600			
50-IN-He	0	5,93	lmno	0,56	o	3,24	G
11-IN-Hb	0	15,33	hijk	9,33	ijklmno	13,22	F
55-BR-Le	0	23	efgh	11,74	ijklm	17,56	EF
19-TH-Hb	0	25,56	defg	11,56	ijklmn	18,56	DEF
2-CA-Hb	0	27,5	cdef	17,11	ghijk	22	CDE
17-SL-Hb	0	26,58	de	15,93	hijk	23,35	CD
31-BR-Hb	0	22,62	efgh	29,11	cde	24,57	BC
4-CA-Hb	1	36	abc	18,56	fghij	28,52	B
28-GH-Hb	1	42,48	a	29,56	cde	36,02	A
30-GH-Hb	1	41,7	ab	32,89	bcd	37,3	A
1-PH-Hb	1	41,33	a	29,55	cde	38,16	A
43-BR-Cs	2	9,5	klmn	3,41	mno	7,12	G
45-BR-Cs	2	10,79	jklmn	22,54	efgh	15,74	F
32-BR-Hb	3	13,52	ijkl	16,81	ghijk	14,62	F
22-MA-Hb	5	2,8	mno	0,87	no	1,83	G
48-BR-Gm	2 + 6	18,49	ghi	16,23	hijk	17,65	EF
Means SI per cultivar		24,79	A	18,24	B		

**Table 3:** Pathogenicity of sixteen *C. cassiicola* isolates carrying different cassiicolin genes on two rubber tree cultivars (PB 217 and RRIM 600). SI = Severity Indexes recorded nine days after spore inoculation. Means SI = mean of “all Severity Indexes per leaf”, per cultivar (last line) and per isolate (last column). Data were analysed using ANOVA and Tukey's HSD test ( $P < 0,05$ ). Different capital letters in the last line (means SI per cultivar) indicate that the corresponding cultivars are significantly different in terms of susceptibility. Different capital letters in the last column (means SI per isolate) indicate that the corresponding isolates are significantly different in term of aggressiveness. Different small letters indicate that the severity indexes of the corresponding “cultivar/isolate” couples are significantly different. Avirulence : SI < 10.

## Discussion

### Cas gene phylogenetic analysis

In the present study, we evidenced the important and structured diversity of the cassiicolin-encoding gene from *C. cassiicola* isolates. The phylogenetic analysis of the *Cas* gene sequences (Fig. 2) revealed six highly supported clades perfectly matching the deduced protein isoforms, or toxin classes. The *Cas* phylogenetic tree suggested that host-specialization may apply in case of the isolates sampled from rubber tree. Indeed, two major groups include exclusively isolates from rubber tree: one is the *Cas1* lineage group, the other encompasses subclades *Cas3*, *Cas4* and *Cas5*. All the isolates from other hosts (cucumber and soybean) were grouped in a strongly supported clade within the *Cas2* (and *Cas6*) lineage groups. One sequence found in a rubber tree isolate (Cc004;GU373839) also fell into the *Cas2* lineage group but it was significantly divergent from the others found in cucumber and soybean isolates and may correspond to a new clade.

The rubber tree-specialization may have been followed by a geographical speciation. Indeed, the major rubber tree-specialized group encompassing *Cas3*, 4 and 5 isolates splits in two subgroups corresponding to Malaysian (*Cas5*) and Brazilian (*Cas3* and 4) isolates respectively. This speciation may have occurred during the domestication of the rubber tree. *Hevea brasiliensis* originates from Brazil, in the Amazonian area. Originally, the latex was collected from wild rubber trees disseminated through the forest, until a few seeds exported by Sir Wickham were used to develop plantations in Asia (initially Malaysia and Indonesia), then in Africa. The *Cas1* rubber tree-specialized group corresponds to isolates mainly found in Africa (Cameroon and Ghana), to the exception of one isolate from Philippines. However, this group is phylogenetically distinct from the *Cas5* lineage group (Malaysian isolates), suggesting that they have evolved independently.

Interestingly the epidemic history followed the sequential domestication of rubber tree, with the first description of the disease in 1958 in India (Ramakrishnan and Pillay 1961) and two years later in Malaysia (Newsam 1960) with a first epidemic burst in the mid 1980's affecting severely Indonesia, Malaysia, Sri Lanka and Thailand (Liyanage et al. 1986a; Chee 1987; Pongthep 1987) and later in the mid 1990's affecting, in addition to Asian countries, African countries like Cameroon, Gabon and Ivory Coast (Wahounou et al. 1996). The first description of CLF in China is very recent (Jinji et al. 2007).

### Global phylogenetic analysis based on neutral markers

A phylogenetic analysis based on the *Cas* gene sequence only cannot account for the global genetic diversity of *C. cassiicola* populations since *Cas* genes could be detected in 42% only of the isolates tested. Furthermore, these genes are certainly under selection pressure. Then, we performed a phylogenetic analysis based on three neutral genes previously described by Dixon et al (2009), on our whole collection enlarged with sequences from Dixon's study (Fig. 3), and analysed the distribution of the toxin classes among the phylogenetic lineage groups. The toxin class *Cas0* was assigned to all isolates without detected *Cas* gene.

No toxin class was assigned to the isolates from Dixon's study since they could not be tested for the presence of *Cas* genes.

This analysis revealed seven distinct phylogenetic groups, thus confirming the important genetic diversity previously stated by different authors using various neutral genetic markers (Darmono et al. 1996; Silva et al. 1998; Saha et al. 2000; Silva et al. 2003; Romruensukharom et al. 2005; Nghia et al. 2008; Dixon et al. 2009; Qi et al. 2009).

In addition to the six major PLs previously described by Dixon et al (2009), our analysis revealed one new strongly supported PL corresponding to the *Cas1* isolates. Globally, the tree based on the *Cas* gene sequences (Fig. 2) and the tree based on the combined neutral genes (Fig. 3) were congruent, with the *Cas1*, 2(+6), 3, 4 and 5 lineage groups integrated in PL7, PL1, PL4, PL5 and PL2 respectively. Isolates *Cas0* were distributed in all lineage groups. PL3 and PL6 were composed mainly of isolates from Dixon's study and therefore could not be related to a toxin class.

The rubber tree-specialization was partially confirmed in this phylogenetic tree. Some rubber tree-specialized clades identified in Fig. 2 (*Cas1* and 5) were matching clades with a majority of rubber tree isolates in Fig. 3 (PL7 and PL2.1). But this was not confirmed for the clades *Cas3* and 4 which fell in clades of mixed host plants in the global phylogenetic tree. This may suggest that *Cas3* and *Cas4* genes are not determining for the specialization/competitiveness of *C. cassiicola* towards rubber tree. New rubber tree-specialized clades were identified among the *Cas0* isolates, such as PL1.2, PL1.6 and PL3.4 which include only rubber tree isolates, from Asia, Gabon and Thailand respectively. These subclades also suggest a geographical speciation within the rubber tree-specialized isolates. The papaya-specialized clade PL1.1 previously identified by Dixon et al (2009) was not supported in our analysis. In addition to the PL1.1, other subclades identified by Dixon et al (2009) were not identified in our study. The discrepancies in bootstrap values between the two studies are probably due to the lack of the *Act1* locus (partial sequence from an actin-encoding gene) in our analysis.

### **Cas gene diversity in relation with pathogenicity in rubber tree**

When relating *Cas* genes diversity to pathogenicity profiles in rubber tree, *Cas1* isolates were found the most aggressive. We previously demonstrated that the *Cas1* gene is functional and transiently expressed in the early phase of the infection (Déon et al. 2012a). Differences in aggressiveness can be observed within the *Cas1* isolates although all remain globally more aggressive than isolates from the other toxin classes (Fig. 3). We have previously shown, by comparing two isolates (4-CA-Hb and 1-PH-Hb in this study), that this could be attributed to differences in the *Cas1* gene expression (Déon et al. 2012a).

The isolate representative of the *Cas5* lineage group (22-MA-Hb, rubber tree isolates from Malaysia), was avirulent on both cultivars. Previous works (Atan and Hamid 2003; Nghia et al. 2008) have identified at least two physiological races among *C. cassiicola* isolates sampled from rubber tree in Malaysia, based on the cultivar preferences: Race 1 isolates severely infected the clones RRIM 600, GT1 and IAN 873, but they showed milder infection on the clones RRIM 2020 and PB 260.

Conversely, race 2 isolates showed opposite cultivar preferences. Since 22-MA-Hb was avirulent on the discriminating cultivar RRIM 600, it is tempting to propose that it belongs to race 2. However, it should be tested on a second discriminating cultivar such as RRIM 2020 in order to conclude.

Isolates in the Cas3 and Cas4 lineage groups were sampled from asymptomatic rubber tree leaves and thus classified as endophytes. The isolate representative of the Cas3 lineage group (32-BR-Hb) was weakly aggressive on both cultivars. In a previous study (Déon et al. 2012b), the same isolate (alias E70) was found pathogenous with high aggressiveness on another rubber tree cultivar, FDR 5788, which suggests specific cultivar preferences. However, no Cas3 transcript could be detected during this interaction suggesting that Cas3 was not the effector responsible for the symptoms observed. In the same study, other endophytic isolates carrying Cas3 or Cas4 genes were able to induce late symptoms, probably following a switch from endophyte to saprophyte, and this independently of any Cas3 or Cas4 expression. The role of Cas3 and Cas4 as potential effector of CLF in rubber tree is therefore unlikely.

Globally, the isolates from the closely related Cas3, Cas4 and Cas5 lineage groups are not highly competitive on the rubber tree cultivars tested. It is interesting to note that all Cas isoforms in these three clades have identical predicted mature cassiicolin domains. It differs from the mature domain of the Cas1 isoform, found in rubber tree-specialized highly competitive isolates, by one amino acid only (S instead of T). The threonine amino acid was shown to carry a o-methyl-mannose moiety (Barthe et al. 2007), but whether this sugar plays a role in the protein toxicity is still unknown. However, it is important to note that both the threonine and the serine amino acids can be o-glycosylated.

The isolates representative of the toxin class Cas2 and Cas2+6, all from cucumber or soybean in Brazil, were either avirulent (43-BR-Cs) or weakly aggressive (45-BR-CS and 48-BR-Gm) on rubber tree. On contrary, the Chinese isolate Cc004 from rubber tree, which carries a distantly related Cas2-encoding gene, was highly aggressive on RRIM 600 and three other cultivars, PR 107, Dafeng 95 and Reyan 7-33-95 (Qi et al. 2009). However, whether or not the Cas2-encoding gene was expressed during this interaction has not been documented and the role of Cas2 in the pathogenicity on rubber tree has not been demonstrated yet.

Cas0 isolates from different hosts and belonging to different PLs induced diverse responses on rubber tree, from avirulence to moderate aggressiveness. The isolate 50-IN-He from hibiscus was avirulent on both cultivars, similarly to the isolate representative of the Cas5 class in this test. Both isolates are genetically related since they belong to the PL2 and PL2.1 groups respectively. Further investigation would be necessary to confirm whether or not all isolates from the PL2 group are non pathogenic on rubber tree. The isolates 11-IN-Hb and 17-SL-Hb, both from the rubber tree-specialized clade PL1.2, showed differences in symptoms intensity, with 17-SL-Hb globally more aggressive than 11-IN-Hb. Differences in aggressiveness between isolates of the same toxin class was observed previously within the Cas1 isolates, as discussed above. The symptoms generated by Cas0 isolates on rubber tree suggest the existence in these isolates of yet undetected effectors. They may be highly divergent forms of cassiicolin, undetected by PCR using our set of primers, or other molecules such as secondary metabolites.

The wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*, for example, produces at least three HSTs including two proteins (Ptr ToxA and Ptr ToxB) and a non proteinaceous low molecular weight molecule (Ptr ToxC) (Ciuffetti et al. 2010).

### **Races and cultivar preferences**

Distinct races of *C. cassicola* can co-exist in the same geographical area. This was first demonstrated with the description of at least two races among rubber tree isolates from Malaysia, discriminated by their cultivar preferences (Atan and Hamid 2003; Nghia et al. 2008). In our global phylogenetic analysis, Malaysian isolates from rubber tree were assigned to two PLs (PL1.2 and PL2.1). It was first thought that they may correspond to the two races previously described. However, the representative isolates for each clade (Cas0 isolates 11-IN-He and 17-SL-Hb for PL1.2 and Cas5 isolate 22-MA-Hb for PL 2.1) were either avirulent or weakly aggressive on the discriminating cultivar RRIM 600. Nghia et al (2008) mentioned the existence of a potential third race, poorly virulent on RRIM 600 like race 2 isolates but with distinct cultivar preferences compared to race 2.

Similarly, rubber tree isolates from Cameroon were distributed into two clades, PL5 (Cas0 in case of the Cameroon isolates) or PL7 (Cas1), which may also suggest two races. However, representative isolates from each group were only slightly different in terms of aggressiveness on both cultivars. Rubber tree isolates from Thailand, all classified as Cas0, were found in three phylogenetic groups (PL1, PL2.1 and PL3.4) but only one isolate, representative of PL3.4, was tested so far. It was avirulent on RRIM 600 and moderately aggressive on PB 217.

Rubber tree isolates from Brazil were found in two clades, PL4 and PL5, without clear difference in terms of pathogenicity features between the two groups.

We have shown that isolates within one toxin class may have different levels of aggressiveness, although with the same cultivar preferences (ie Cas1 isolates in Fig. 4). This makes the identification of races based on cultivar preferences uneasy. However, the description of *C. cassicola* genetic structure provided in this analysis should help predicting potential races that will then be confirmed by physiological analyses, using several selected isolates per genetic group inoculated on a larger range of cultivars.

### **Host specificity**

Dixon et al (2009) previously found that certain *C. cassicola* isolates could infect specific hosts only while others had a larger host-range. More precisely, only isolates from papaya (all belonging to the same clade PL1.1) were found pathogenic on papaya. In our study, some isolates from cucumber (42, 44 and 45-BR-Cs) and soybean (49-BR-Gm), grouped in the new PL1.7, were previously found pathogenic on the papaya “sunrise” variety (Oliveira et al, 2007), in disagreement with Dixon’s conclusions. This was observed also for two other isolates from the PL4, from tomato (55-BR-Le) and *Piper hispidinervum* (57-BR-Ph). In addition, Dixon et al (2009) concluded that isolates from the PL1 were not pathogenic on tomato, while Oliveira et al (2007) showed that isolates 42, 44 and 45-BR-Cs and 47 and 49-BR-Gm from PL1.7 were pathogenic on the tomato variety “Santa Clara”.

The discrepancies between the two studies may be attributed to differences in the varieties used for the inoculation tests. Indeed, it is now well documented that the susceptibility of a given *C. cassiicola* isolate depends on the cultivar, whether in rubber tree (Breton et al. 2000; Nghia et al. 2008; Qi et al. 2009; Déon et al. 2012a) or in other plants (Oliveira et al. 2007).

It should now be tested whether isolates from host-specialized clades are pathogenic to their host of origin only or to a larger range of plants. This was done previously with our reference isolate 1-PH-Hb (alias CCP), representative of the rubber tree-specialized PL7 (Cas1) group, which was found to induce symptoms on a restricted host range (7 plant species out of the 14 tested), in good concordance with the sensitivity to the purified Cas1 toxin (Barthe et al. 2007). New *C. cassiicola* isolates supporting the *Cas1* gene should be found on others hosts that are susceptible to the Cas1 toxin.

The combination of different effectors in the same isolate, such as Cas2 and Cas6 in the Brazilian isolates 48 and 49-BR-Gm, may be a strategy to enlarge the host range. This is the case for example in the wheat/*P. tritici-repentis* pathosystem where combinations of different host-specific toxins delineate races with different cultivar host-ranges compared to isolates with a single toxin (Andrie et al. 2007).

## Conclusion

This study reflects the complexity of the *C. cassiicola* infection strategies. Its large host range (interspecific level) and its cultivar preferences inside each host plant specie support the hypothesis that various effectors may contribute to its pathogenicity. Currently, only one potential disease effector, the cassiicolin toxin encoded by *Cas1*, was characterized and shown to be involved in the pathogenicity of the isolates carrying this gene, on rubber tree. However, other isolates carrying genes encoding variant forms of cassiicolin, or isolates in which no *Cas* gene variant could be detected, can also be pathogenous on rubber tree.

This work suggests that the cassiicolin gene diversity may contribute to the phylogenetic structuration of *C. cassiicola*, thus confirming the importance of this gene in the evolutionary history of the fungus. However, further analysis of the pathogenicity features should be conducted, with more isolates selected in each phylogenetic group and a larger range of cultivars, in order to relate more precisely the genetic group, the toxin classes and the physiological races of *C. cassiicola*. In addition, other disease effectors potentially contributing to the genetic structuration remain to be discovered and should also be considered, when available, in future phylogenetic studies.

## Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the IFC (Institut Français du Caoutchouc, Paris, France) and the companies Michelin (Clermont-Ferrand, France), SIPH (“Société Internationale de Plantations d’Hévéas”, Courbevoie, France) and SOCFIN (“Société Financière des Caoutchoucs”, Bruxelles, Belgium).



## *DISCUSSION GENERALE*





Les premiers travaux visant à caractériser plus finement la molécule toxique sécrétée par *C. cassiicola* dans des milieux de culture liquide ont démarré avec la purification partielle de ce composé toxique, une petite glycoprotéine nommée cassiicoline, à partir du filtrat de culture d'une souche originaire des Philippines (CCP) (Breton 1997; Breton et al. 2000). Plus tard, un nouveau procédé de purification établi par de Lamotte et al (2007) a permis l'obtention de cassiicoline ultra pure en quantité suffisante pour finaliser le séquençage de la protéine et caractériser sa structure tridimensionnelle par RMN (Barthe et al. 2007). Toutes ces études étaient jusque là limitées à un seul isolat (CCP) à partir duquel la toxine avait pu être isolée. Grâce au clonage du gène codant pour la cassiicoline, les travaux réalisés au cours de cette thèse, élargis à une collection de souches de différentes origines géographiques, prélevées sur hévéa mais également sur d'autres plantes hôtes, ont permis de préciser le rôle de la cassiicoline dans la pathogénie et de progresser dans la compréhension des mécanismes de l'interaction *C. cassiicola*/ hévéa.

## **I. La cassiicoline, effecteur de la CLF chez l'hévéa ?**

De nombreux arguments concordent pour désigner la cassiicoline comme un effecteur de maladie important impliqué dans la CLF chez l'hévéa. Des travaux antérieurs à la thèse avaient montré une bonne concordance entre la sensibilité des clones d'hévéa au champignon (estimée d'après la taille des nécroses induites suite à l'inoculation d'une suspension conidienne) et leur sensibilité au filtrat de culture ou à la toxine purifiée (estimée d'après le pourcentage de flétrissement des folioles d'hévéa au contact de la toxine), mettant ainsi en évidence le rôle primordial de la cassiicoline dans la pathogénie de la souche qui la produit (CCP). De plus, des inoculations sur feuilles d'un clone sensible (PB 260) réalisées avec une suspension conidienne additionnée d'anticorps anti-cassiicoline avaient révélé une diminution importante de la sévérité des symptômes par rapport au témoin inoculé sans anticorps. A l'inverse, l'inoculation d'une souche non pathogène additionnée de cassiicoline partiellement purifiée sur feuilles du clone sensible avait révélé une augmentation de l'intensité des symptômes (Breton et al. 2000).

Nous avons montré que le gène codant la toxine produit un pic d'expression juste avant l'apparition des premiers symptômes, suggérant un rôle dans les phases précoces de l'infection.

Nos résultats contribuent également à préciser le rôle de la cassiicoline dans les différences d'agressivité des souches de *C. cassiicola*. Préalablement à notre étude, l'analyse de la toxicité du filtrat de culture de plusieurs souches d'agressivité contrastée sur feuilles d'un clone sensible avait mis en évidence une bonne concordance entre la sensibilité du clone aux filtrats de culture et sa sensibilité aux isolats correspondant. L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-cassiicoline avait permis de montrer que la présence de cassiicoline en quantité variable dans les différents filtrats testés (Dot Blot) était proportionnelle à l'intensité des symptômes induits par ces filtrats (Breton et al. 2000). Ces résultats avaient conduit à émettre l'hypothèse que des différences quantitatives de production de cassiicoline pouvaient contribuer à expliquer les différences de toxicité des filtrats et, par extension, d'agressivité des souches.

Afin de vérifier l'hypothèse quantitative, nous avons comparé deux souches d'agressivité différentes, CCP (très agressive) et CCAM3 (modérément agressive) porteuses du même gène de cassiicoline. La purification des toxines, associée à une analyse par spectrométrie de masse, n'a révélé aucune différence de masse entre les toxines des deux souches indiquant que le différentiel de toxicité des filtrats observé ne pouvait être attribué à des variations qualitatives de la protéine. Parallèlement, des études d'expression du gène de cassiicoline (*Cas1*) sur le mycélium des souches CCP et CCAM3 en culture liquide ont révélé un différentiel d'expression entre ces deux souches pouvant expliquer une accumulation plus importante de toxine dans le filtrat CCP par rapport à CCAM3, en accord avec sa plus forte toxicité. Nous avons entrepris de faire synthétiser des anticorps polyclonaux dirigés contre la cassiicoline purifiée afin de vérifier la corrélation entre l'expression du gène, la quantité de toxine produite et la toxicité observée mais la synthèse a échoué. Cependant, nos données d'expression corroborent les résultats de Breton et al (2000) qui avaient montré, à l'aide d'anticorps anti-cassiicoline, une plus forte accumulation de cassiicoline dans le milieu de culture de la souche CCP comparé à la souche CCAM3. Tous ces résultats ne concernent que des expérimentations réalisées *in vitro* et il était important de tester l'implication directe de la cassiicoline lors de l'infection *in vivo*. L'expression du gène codant pour la cassiicoline a ainsi été testée par PCR quantitative à partir de nécroses prélevées à différents temps de cinétiques après inoculation de suspension de spores des souches CCP et CCAM3 sur les clones sensible PB 260 et tolérant RRIM 600. Une plus forte accumulation de transcrits a été observée pour la souche CCP comparée à CCAM3 quel que soit le clone inoculé. Sur le clone tolérant RRIM 600, ces résultats d'expression corroborent le différentiel d'agressivité observé entre les deux souches puisque CCP apparaît significativement plus agressive que CCAM3. Par contre, sur le clone sensible PB 260, le différentiel d'expression ne corrobore pas parfaitement les résultats d'inoculation puisque les intensités de symptômes, très élevées sur ce clone sensible, ne sont pas significativement différentes entre CCP et CCAM3. Ce clone étant extrêmement sensible à la cassiicoline purifiée, il est probable qu'il ne discrimine pas bien les souches au-delà d'une certaine quantité de cassiicoline produite.

La comparaison des profils d'expression des deux souches sur les deux clones révèle plusieurs différences. D'abord, les pics d'expression associés aux deux souches sont détectés plus précocement chez le sensible (1 jour) que chez le tolérant (2 jours). De plus, les niveaux d'expression sont globalement plus importants sur le clone tolérant que sur le clone sensible. Il serait intéressant de vérifier l'expression du gène de cassiicoline pour des temps encore plus précoces car il est possible que le maximum d'expression sur le clone sensible PB 260 se produise avant 24h avec un niveau de transcrits encore plus élevé. Si c'est le cas, il faudrait vérifier l'hypothèse d'un facteur clonal ayant pour effet de retarder l'expression du gène *Cas1* dans le champignon.

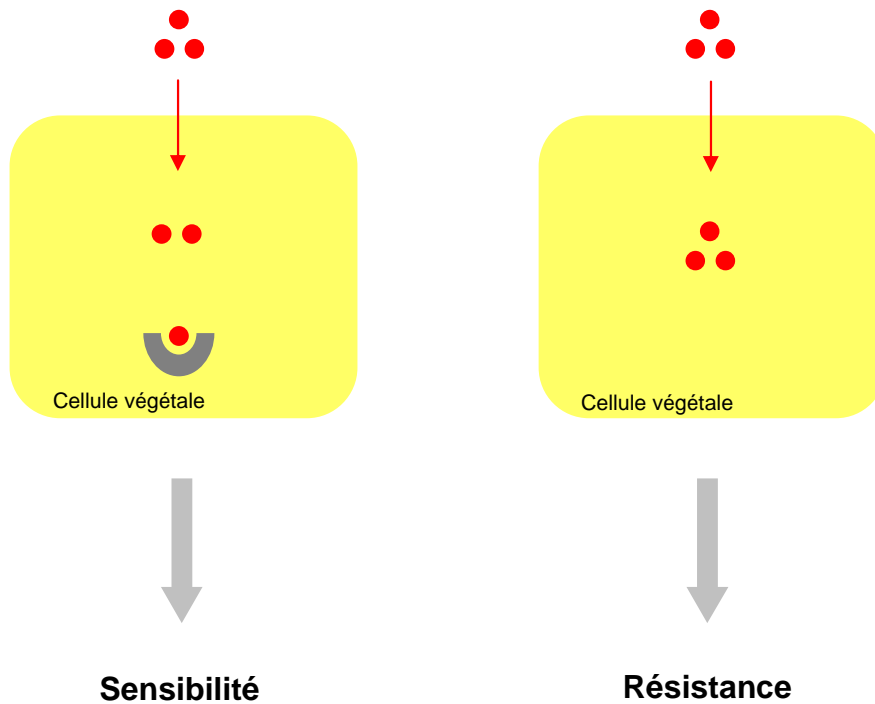
Des résultats similaires ont pu être observés pour Ptr ToxB, une toxine protéique hôte-spécifique produite par l'agent pathogène du blé *P. tritici-repentis*. En effet, des données d'expression du gène codant pour Ptr ToxB ont montré une bonne corrélation entre la quantité de transcrit et l'intensité des symptômes sur un cultivar de blé sensible.

De plus, une forte activité transcriptionnelle a été détectée avant l'apparition des premiers symptômes avec un pic d'expression à 1 jour chez le sensible plus tardif chez le résistant, ceci pour les deux isolats testés fortement et modérément agressifs (Amaike et al. 2008). Il a également été montré que l'agressivité des isolats était dépendante du nombre de copie du gène codant pour Ptr ToxB (Strelkov et al. 2006; Amaike et al. 2008). Chez nos deux souches CCP et CCAM3, des résultats de Southern blot suggèrent que *Cas1* est présent en simple copie dans les deux isolats. Les quantités variables de transcrits détectées semblent donc être liées à des régulations transcriptionnelles différentes du gène *Cas1* entre les deux souches.

Toutes ces données suggèrent que la pathogénie de ces deux souches, porteuses de la même forme toxique (*Cas1*), suivrait un modèle quantitatif selon lequel l'agressivité serait dépendante de la quantité de toxine produite, elle-même liée au niveau d'expression du gène codant pour la protéine. Cependant, les quantités physiologiques de cassiicoline produites par ces deux souches *in vivo* n'ont pas pu être estimées et il est possible que d'autres effecteurs puissent avoir un effet toxique additif à la cassiicoline. De plus, ces résultats ne sont pas généralisables à l'ensemble des souches car, comme il sera discuté plus loin, toutes ne sont pas porteuses du même gène de cassiicoline.

Un point important à discuter qui n'a pas été abordé dans l'article du chapitre 1 concerne le décalage observé sur le clone RRIM 600 entre le niveau de symptômes obtenu en inoculation avec la souche CCP (moyen) et celui induit par la cassiicoline purifiée (très faible). En effet, le léger brunissement induit par la cassiicoline purifiée autour de la zone dépôt pourrait tout aussi bien résulter d'un mécanisme de défense aspécifique suite à la reconnaissance de la cassiicoline comme étant du non-soi par la plante. Le clone RRIM 600 pourrait donc être considéré comme résistant à la cassiicoline mais seulement tolérant en réponse à l'inoculation. Dans ce cas, l'agressivité modérée de CCP sur ce clone serait attribuée à un autre effecteur de pathogénie. Cette hypothèse prend tout son sens au vu d'un résultat obtenu récemment lors d'une opération de purification de cassiicoline révélant la présence dans le milieu de culture de la souche CCP d'un autre effecteur toxique (de Lamotte, communication personnelle). La fraction purifiée correspondant à ce nouveau composé toxique a été soumise à une analyse en spectrométrie de masse mais aucune masse détectable n'a pu être mesurée suggérant que la molécule toxique n'était pas de nature peptidique. Il pourrait s'agir d'un métabolite secondaire mais d'autres techniques doivent être utilisées pour identifier sa nature chimique.

La présence de ce second effecteur dans le filtrat de la souche CCP n'a pas pu être révélée lors de l'application de filtrat sur feuilles du clone PB 260 compte tenu de sa forte sensibilité à la cassiicoline (révélée par application de cassiicoline purifiée). Cependant, il n'est pas exclu que ce nouvel effecteur puisse avoir un effet toxique additif à la cassiicoline sur ce clone. Sur le clone tolérant RRIM 600, l'application du filtrat de CCP induit une petite nécrose (Chap. 1, Fig. 5B).



**Figure 16 : Modèle décrivant l'interaction « gène-pour-gène » inverse dans les pathosystèmes nécrotrophes entraînant l'ETS.**

Dans ce modèle, la sensibilité de l'hôte à un effecteur (HST) ( ● ) et sa sensibilité à la maladie implique une reconnaissance spécifique (directe ou indirecte) de l'effecteur par une protéine de l'hôte ( U ) (protéine de sensibilité). A l'inverse, l'absence de reconnaissance de l'effecteur par la plante entraîne la résistance à la maladie.

La reconnaissance entre l'effecteur et la protéine de sensibilité de l'hôte a été représenté s'opérer à l'intérieur des cellules de l'hôte mais elle pourrait également s'opérer dans l'apoplasme.

Bien que la surface nécrosée ne soit pas statistiquement différente de la surface observée suite à l'application de milieu de culture sans champignon (Chap. 1, Fig. 2), l'observation qualitative des symptômes, suite à l'application du filtrat de CCP sur ce clone, montre un léger effet de diffusion de la nécrose le long des nervures (Chap. 1, Fig. 5B) qui n'était pas visible suite à l'application de cassiicoline purifiée (Chap. 1, Fig. 3). Cette légère toxicité pourrait effectivement résulter de la présence d'un second effecteur dans le filtrat de la souche CCP. Cette hypothèse doit être confirmée mais pose néanmoins la question de la part qu'occuperait chacun de ces effecteurs dans la pathogénie.

Plusieurs effecteurs de pathogénie peuvent coexister dans une même souche pathogène, différentes combinaisons d'effecteurs définissant des spectres d'hôtes particuliers (Lamari et al. 2003). L'agent pathogène de blé *P. tritici-repentis* peut produire jusqu'à quatre toxines hôte spécifiques dont deux sont des protéines et une un métabolite secondaire, la dernière n'étant pas encore caractérisée (Ballance et al. 1989; Tomas et al. 1990; Tuori et al. 1995; Ciuffetti et al. 1998 ; Strelkov et al. 1999; Martinez et al. 2001; Effertz et al. 2002). Chez *S. nodorum*, cinq toxines protéiques ont été mises en évidence (Liu et al. 2004a; Liu et al. 2004b; Friesen et al. 2006; Friesen et al. 2007; Friesen et al. 2008b). Il a d'ailleurs été montré que chez un cultivar de blé sensible à plusieurs effecteurs, les effets toxiques associés étaient additifs (Friesen et al. 2007).

## **II. Sensibilité des clones à la cassiicoline : une interaction « gène-pour-gène » ?**

Des différences de sensibilité très contrastées à la cassiicoline purifiée ont été mises en évidence entre les clones PB 260 et RRIM 600. Des différences clonales de sensibilité à la toxine semi-purifiée avaient déjà été montrées pour une cinquantaine de clones par Breton et al (2000). Ces données impliquent donc l'existence d'un ou plusieurs facteur(s) plante déterminant le niveau de sensibilité. Dans les pathosystèmes nécrotrophes impliquant des toxines protéiques hôte-spécifiques (issues de la synthèse ribosomale), il a été montré que la sensibilité était un trait dominant. L'agent pathogène produit un effecteur qui entraîne la maladie chez une plante hôte portant un récepteur spécifiquement requis pour la sensibilité. Ce processus, qui mène à l'ETS dans le cas des pathosystèmes nécrotrophes, a été proposé comme étant un miroir de l'interaction « gène-pour-gène » classiquement décrite dans les pathosystèmes biotrophes. Dans le modèle « gène-pour-gène » classique, l'interaction entre les produits d'un gène de résistance de l'hôte et d'un gène d'avirulence de l'agent pathogène entraîne l'immunité (ETI). Dans le modèle inverse propre aux nécrotrophes, l'interaction entre les produits d'un gène de sensibilité dominant de l'hôte et d'un effecteur de l'agent pathogène entraîne la sensibilité ou ETS (Wolpert et al. 2002; Friesen et al. 2008a). Ainsi, l'absence de l'effecteur coté champignon ou du récepteur coté plante résulte en une interaction incompatible (pas de maladie) si aucune autre interaction effecteur/récepteur n'est présente. Les modèles théoriques de l'interaction « gène-pour-gène » inverse sont présentés dans la figure 16.

La sensibilité des clones d'hévéa à la cassiicoline pourrait suivre ce modèle (Figure 16). Le clone sensible PB 260 posséderait donc un récepteur spécifique qui interagirait avec la cassiicoline conduisant à l'ETS. Des résultats antérieurs basés sur l'étude de la cinétique de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez deux clones d'hévéa, PB 260 et GT 1, respectivement sensible et résistant à la cassiicoline, permettent d'apporter des arguments en faveur de ce modèle inverse « gène-pour-gène » (Breton et al, 1997). Dans de nombreux pathosystèmes impliquant des agents pathogènes biotrophes, la cinétique de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez l'hôte a souvent été utilisée pour distinguer les réactions incompatibles hôtes menant à l'ETI (réactions hypersensibles issues d'une interaction « gène-pour-gène ») des réactions incompatibles non-hôtes (Dixon et al. 1994). Généralement le premier pic d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est commun aux réactions compatibles et incompatibles, alors que l'apparition d'un second pic plus tardif serait caractéristique de la réaction hypersensible impliquant une interaction « gène-pour-gène » (incompatibilité hôte). Breton et al (1997) ont étudié cette cinétique chez les deux clones PB 260 et GT 1 suite à l'inoculation par la souche CCP. Ils ont pu mettre en évidence un premier pic d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les deux clones alors qu'un second pic plus tardif n'a pu être détecté que chez le clone sensible PB 260. Ces résultats pourraient suggérer la présence d'une interaction spécifique entre la cassiicoline et un facteur de sensibilité chez le clone sensible. Cette interaction pourrait déclencher une réaction de type hypersensible, favorable au développement du champignon *C. cassicola* puisqu'il est nécrotrophe. On serait donc bien dans le cas d'une interaction « gène-pour-gène » inverse entraînant l'ETS. L'absence du second pic d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le clone résistant GT 1 suggère une absence d'interaction « gène-pour-gène ». La résistance de ce clone à la cassiicoline serait liée à l'absence de reconnaissance spécifique de la toxine par la plante (Figure 16).

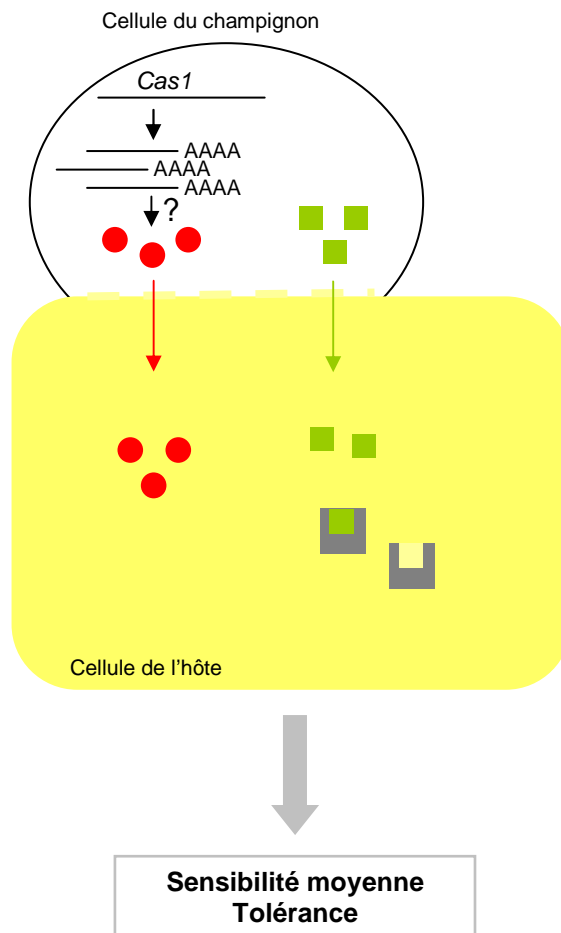
Concernant le clone tolérant RRIM 600, comme nous l'avons vu précédemment, une ambiguïté persiste quand à sa tolérance ou à sa résistance à la cassiicoline purifiée. Si l'on considère que ce clone est tolérant à la cassiicoline purifiée, cela impliquerait qu'il y a reconnaissance de la toxine par la plante car sinon on parlerait de résistance. Mais quel(s) pourraient être le(s) facteur(s) de la plante limitant l'effet de la cassiicoline par rapport à un clone sensible ? Différentes hypothèses peuvent être émises. Cette tolérance pourrait être due à un plus faible nombre de copie ou une plus faible affinité du récepteur interagissant avec la cassiicoline. La présence d'un mécanisme de détoxification de la cassiicoline permettant de limiter sa reconnaissance par le récepteur pourrait également être envisagée. Ce phénomène de détoxification a déjà été décrit chez les génotypes de maïs résistants à la HC-toxine produite par *C. carbonum*. Il résulte de l'expression du gène *Hm1* qui code pour une HC-toxine réductase. Cette dernière interagit directement avec la HC-toxine en l'inactivant, en amont de son interaction avec sa cible (Meeley and Walton 1991; Johal and Briggs 1992). Cependant, comme nous l'avons discuté précédemment, la quasi absence de symptômes observée suite à l'application de cassiicoline purifiée sur le clone RRIM 600 serait en faveur de la résistance de ce clone à la toxine. De plus, la mise en évidence d'un nouvel effecteur dans le milieu de culture de la souche CCP permettrait d'expliquer que RRIM 600 soit résistant à la cassiicoline mais pas à l'inoculation par le champignon. Ce nouvel effecteur, de toxicité *a priori* plus faible que la cassiicoline, pourrait contribuer à l'agressivité moyenne de la souche sur ce clone.

Les mécanismes qui pourraient gouverner la tolérance de ce clone vis-à-vis de la souche CCP sont schématisés dans la figure 17.

Prenant en compte la présence de ce nouvel effecteur produit par la souche CCP, deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la sensibilité du clone PB 260 à la souche CCP (Figure 18A et B). La première pourrait être que la cassiicoline et ce nouvel effecteur sont tous les deux reconnus de manière spécifique par la plante, avec un effet additif des deux interactions (Figure 18A). Il est également possible que ce nouvel effecteur ne soit pas reconnu spécifiquement par la plante et n'ait alors aucun impact sur la sensibilité de ce clone (Figure 18B), toute la toxicité observée étant alors imputable à la cassiicoline.

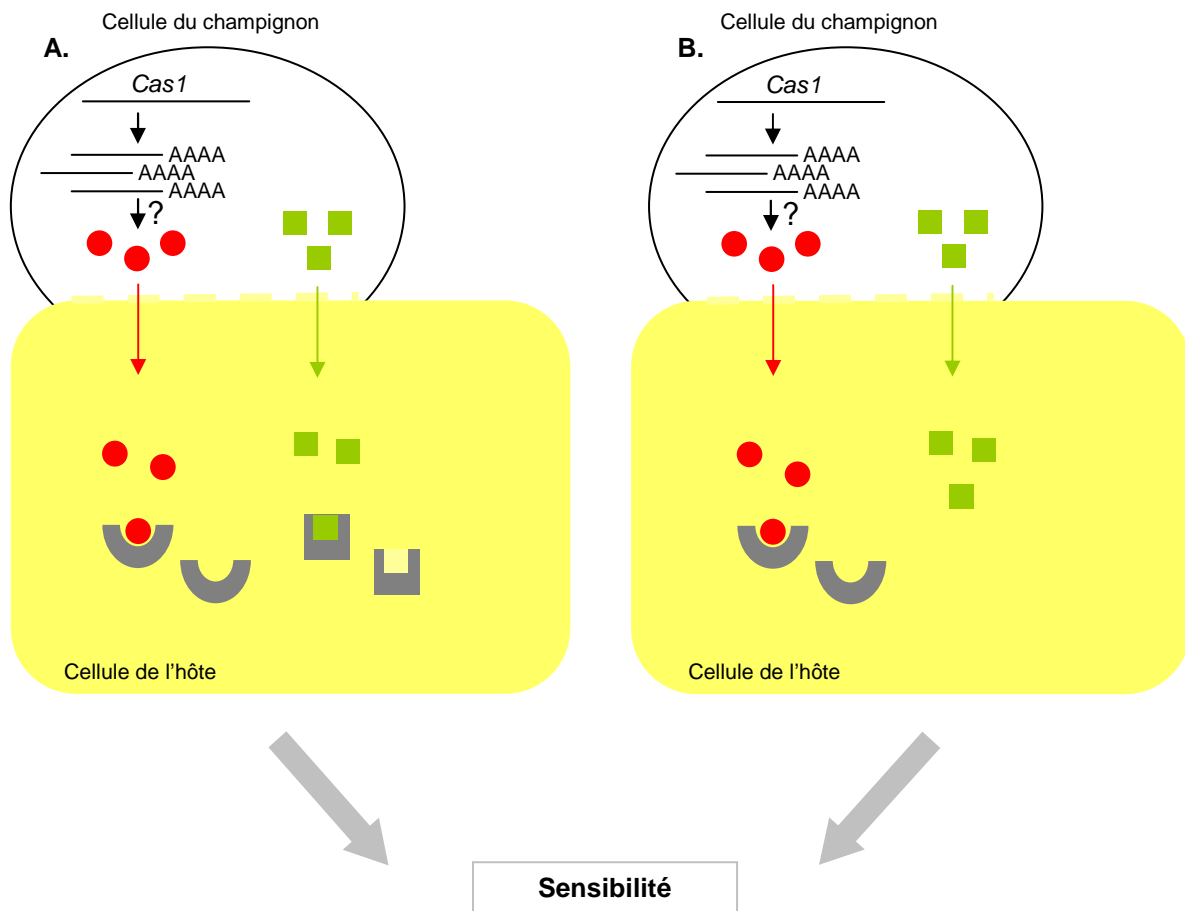
Concernant le clone GT 1, Breton et al (2000) ont montré qu'il était à la fois résistant à la souche CCP et à la cassiicoline. Ces résultats pourraient indiquer l'absence de reconnaissance de la cassiicoline et du deuxième effecteur par la plante (Figure 19).





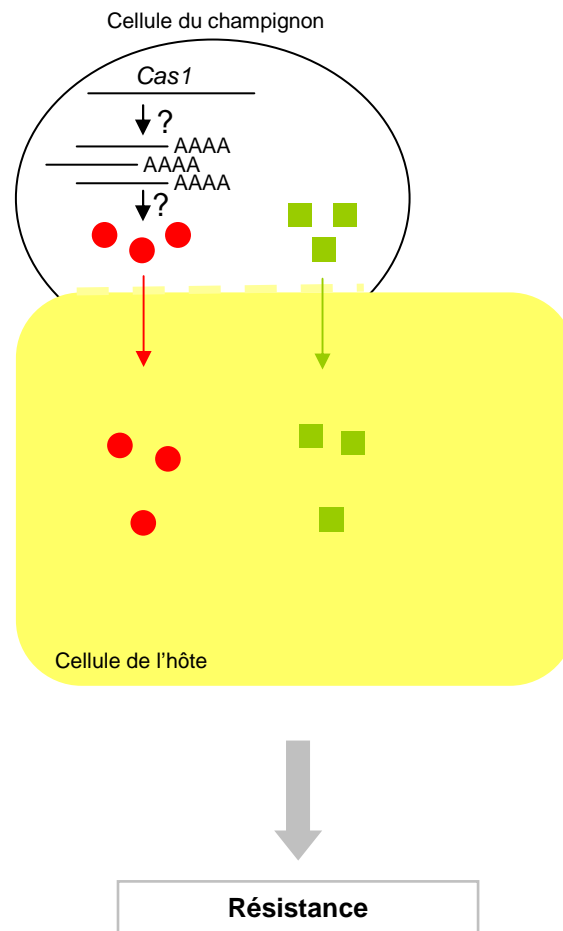
**Figure 17 : Mécanismes pouvant expliquer la tolérance du clone RRIM 600 à la souche CCP.**

Dans ce modèle, le clone RRIM 600 est considéré comme résistant à la cassiicoline (●) ce qui sous-entend l'absence de reconnaissance de la toxine par la plante. Les symptômes observés suite à l'inoculation de la souche CCP pourraient alors être attribués à un autre effecteur (■) produit par CCP, mais de plus faible toxicité que la cassiicoline, qui interagirait de manière spécifique avec un autre récepteur dans l'hôte (■) entraînant alors la maladie (ETS) avec un niveau de symptômes modéré.



**Figure 18 : Mécanismes pouvant expliquer la sensibilité du clone PB 260 à la souche CCP.**

Le clone PB 260 est très sensible à la cassicoline purifiée (●) ce qui implique une reconnaissance spécifique de la toxine par un récepteur de la plante (U). Deux modèles sont proposés quand au rôle du deuxième effecteur (■) dans la sensibilité de PB 260 à la souche CCP : soit la plante possède un récepteur (L) capable de reconnaître spécifiquement ce nouvel effecteur (A), et dans ce cas, la sensibilité de ce clone à la souche CCP serait due aux effets additifs de ces deux effecteurs ; soit la plante ne reconnaît pas spécifiquement ce nouvel effecteur (B) et la sensibilité du clone est alors exclusivement liée à l'effet de la cassicoline



**Figure 19 : Mécanismes pouvant expliquer la résistance du clone GT 1 à la souche CCP.**

Le clone GT1 est résistant à la cassiicoline (●) impliquant l'absence d'une reconnaissance spécifique de la toxine par un récepteur de la plante. De plus ce clone est également résistant à la souche CCP sous entendant l'absence de reconnaissance du deuxième effecteur (■) par un récepteur de la plante.

### III. Diversité des gènes de cassiicoline et pathogénie

Notre travail a permis de mettre en évidence une importante diversité des gènes de cassiicoline codant pour diverses isoformes protéiques de la toxine chez *C. cassiicola*. Six isoformes protéiques potentielles ont été identifiées parmi lesquelles quatre (Cas1, Cas3, Cas4 et cas5) ont été exclusivement trouvées dans des isolats prélevés sur hévéa. Les formes Cas2 et Cas6 ont été, quand à elles, identifiées à partir de souches brésiliennes provenant d'autres hôtes (concombre et soja). Les formes Cas6 ont été isolées dans des souches pathogènes du soja portant également l'isoforme Cas2.

Toutes les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfure de la protéine Cas1 (Barthe et al. 2007) sont conservées pour l'ensemble des isoformes, y compris les plus divergentes Cas2 et Cas6 (Chap. 3, Fig. 1). Ceci suggère que la structure secondaire est importante pour la fonctionnalité de la protéine puisqu'elle est conservée au cours de l'évolution.

L'analyse de la diversité nucléotidique des gènes *Cas* a révélé six clades correspondant aux six isoformes protéiques de cassiicoline (Chap. 3, Fig. 2). Parmi les isolats provenant de l'hévéa, deux groupes semblent avoir évolué indépendamment: le premier correspond au clade des souches Cas1 qui se sont révélées être les plus agressives sur hévéa ; le deuxième rassemble trois clades correspondant aux isoformes Cas3, Cas4 et Cas5 respectivement. Les souches représentatives de ces trois classes toxiques se sont révélées globalement moins agressives en inoculation que les souches de la classe toxique Cas1, voire même avirulentes (Chap. 3, Fig. 4 et tableau 3).

Les isoformes protéiques Cas3, 4 et 5 sont identiques entre elles dans la partie mature de la protéine et ne diffèrent que d'un acide aminé (S au lieu de T) par rapport à la partie mature de Cas1, la forme toxique initialement caractérisée (Chap. 3, Fig. 1) (Barthe et al. 2007; de Lamotte et al. 2007). Dans la partie mature de Cas1, c'est cet acide aminé (T) qui porte le groupement sucré O-méthyl mannose. Le rôle joué par ce sucre dans la toxicité de la molécule n'est pas connu mais il a été montré que la déglycosylation de certaines toxines pouvait entraîner la perte de leur activité. Par exemple, la déglycosylation d'une phytotoxine associée à la maladie du flétrissement de la gaine du riz (« sheath blight disease ») par une glucosidase extracellulaire produite par *Trichoderma viride*, a eu pour effet d'inactiver la toxine (Shanmugam et al. 2001). La substitution de la thréonine par une sérine pourrait-elle affecter la glycosylation de la cassiicoline et donc potentiellement sa toxicité ? Ceci pourrait expliquer la plus forte agressivité des souches de la forme Cas1 par rapport aux souches des formes Cas3, 4 et 5. Cependant, la sérine peut également être O-glycosylée, ce qui n'est pas en faveur de cette hypothèse.

Dans le cas des isolats prélevés sur hévéa, la spécialisation par l'hôte (hévéa) aurait été suivie d'une spécialisation géographique qui pourrait expliquer la séparation des isolats Cas3, 4 et 5 en deux groupes distincts : un clade correspondant aux isolats de Malaisie (Cas5) et un groupe correspondant aux isolats brésiliens (Cas3 et 4) (Chap. 3, Fig. 2). Ce phénomène de spécialisation géographique pourrait s'être effectué au cours de la domestication de l'hévéa, espèce originaire du Bassin Amazonien qui a ensuite été implanté en Malaisie et Indonésie puis en Afrique.

Les souches des clades Cas3 et Cas4 correspondent à des isolats endophytes prélevés au Brésil, région encore indemne de CLF ; Ils sont capables d'induire des symptômes sur leur clone d'origine, dans nos conditions d'inoculation contrôlées (Chap. 2, Fig. 4 et 5). Globalement les symptômes apparaissent plus tardivement que dans le cas d'une souche pathogène de type Cas1 et sont plus faibles. Aucune activité transcriptionnelle des gènes Cas3 et Cas4 n'a pu être détectée durant l'infection (Chap. 2, Fig. 7). Nous pouvons faire l'hypothèse que ces isolats sont restés proches d'une forme ancestrale présente au Brésil, ayant un mode trophique endophyte ou parasite peu compétitif sur hévéa ne nécessitant pas l'intervention d'une forme de toxine très agressive. A l'inverse, l'évolution vers (ou l'acquisition de) la forme toxinique Cas1, très agressive sur hévéa, aurait contribué à sélectionner un nouveau groupe de souches hautement compétitives sur hévéa.

Les isolats porteurs des formes toxiques Cas2 et Cas2+6, tous issus d'autres plantes que l'hévéa, sont plus éloignés en termes évolutif des isolats issus de l'hévéa et se retrouvent dans des groupes génétiques ne présentant pas de spécialisation par l'hôte (Chap. 3, Fig.2 et 3). De plus, ils se sont révélés avirulents ou très faiblement agressifs sur hévéa dans nos conditions d'analyses, ce qui suggère que l'hévéa ne fait pas partie de leurs hôtes privilégiés (Chap. 3, Fig. 4). Il sera intéressant de tester leur agressivité ainsi que l'expression des gènes Cas2 et Cas6 en condition d'inoculation, comparativement sur hévéa et sur leurs hôtes d'origine, pour vérifier cette hypothèse.

La forme toxinique Cas1 n'est clairement pas la seule responsable de la pathogénie de *C. cassiicola* sur hévéa. En effet, des souches dépourvues de gène de cassiicoline (classe toxinique Cas0) peuvent néanmoins engendrer des symptômes sur hévéa, suggérant qu'un autre effecteur que la cassiicoline pourrait être responsable de la pathogénie de ces souches sur hévéa (Chap. 3, Fig. 4). Il en est de même pour les souches endophytes générant des symptômes *à priori* sans intervention des gènes Cas.

L'analyse phylogénétique globale des souches de l'ensemble de notre collection a révélé une importante diversité confirmant de nombreux travaux utilisant divers marqueurs neutres (markers (Darmono et al. 1996; Silva et al. 1998; Saha et al. 2000; Silva et al. 2003; Romruensukharom et al. 2005; Nghia et al. 2008; Dixon et al. 2009; Qi et al. 2009). Une bonne concordance entre l'appartenance des isolats à une classe toxinique et leur appartenance à un groupe génétique a pu être observée ce qui suggère que ces formes toxiques jouent un rôle important en terme évolutif pour les groupes de souches concernés (Chap. 3, Fig. 3). Les isolats Cas0, quand à eux, se retrouvent dans tous les groupes génétiques et certains clades sont constitués exclusivement d'isolats Cas0. La classe toxinique Cas0 signifiant l'absence de détection d'isoforme de gène Cas pourrait recouvrir une certaine diversité en termes d'effecteurs.

L'hypothèse d'une spécialisation des isolats par l'hôte (en prenant en compte l'hôte sur lequel ont été prélevés les souches) est relativement bien confirmée par l'analyse phylogénétique globale, même si certains isolats issus de l'hévéa sont regroupés avec des isolats prélevés sur d'autres plantes hôtes. Néanmoins, il faudra tester ces souches en inoculation sur d'autres plantes que l'hévéa pour déterminer leur gamme hôte effective. En effet, il semblerait que *C. cassiicola* possède une gamme d'hôtes spécifique et non pas un hôte unique. Il peut y avoir deux explications possibles à ce phénomène :

- 1) La cassiicoline pourrait être efficace en tant qu'effecteur de pathogénie sur plusieurs espèces hôtes différentes. En effet, elle peut engendrer des symptômes sur d'autres plantes que l'hévéa mais selon une gamme hôte restreinte (Barthe et al. 2007). Dans l'hypothèse où la cassiicoline est une toxine hôte spécifique, cela sous-entend que seules les plantes porteuses du facteur spécifique de sensibilité à Cas1 seront réactives vis-à-vis de la toxine.
- 2) Il pourrait y avoir cumul de plusieurs effecteurs dans une même souche contribuant à élargir la gamme hôte. Nos résultats montrant la présence de deux gènes codant pour des isoformes différentes de cassiicoline dans une même souche (Cas2 et Cas6) appuient cette hypothèse, de même que la mise en évidence d'une autre fraction toxique, de nature non protéique, dans le filtrat de culture de la souche CCP. Différentes combinaisons d'effecteurs pourraient contribuer à définir des races ayant des spécificités d'hôte ou des préférences clonales distinctes, comme dans le cas de *P. tritici-repentis* chez le blé (Ciuffetti et al, 2010). Dans le cas de l'hévéa, la définition de races d'après les préférences clonales des souches est ambiguë et difficile à appliquer car il n'existe *a priori* pas de couple de clones capable de discriminer l'ensemble des souches.



# *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*





## **I. Conclusions**

Nos résultats renforcent l'hypothèse du rôle déterminant de la cassiicoline en tant qu'effecteur de la CLF chez l'hévéa intervenant dans les phases précoces de l'infection. Nous avons également pu montrer que pour deux souches porteuses de la même forme toxinique, l'agressivité était corrélée au niveau d'expression du gène de cassiicoline, ce qui valide le modèle quantitatif selon lequel l'agressivité des souches serait dépendante de la quantité de toxine produite. Cependant, il est possible que d'autres effecteurs puissent avoir un effet additif à celui de la cassiicoline, comme le suggère la détection récente d'une nouvelle fraction toxique en plus de la cassiicoline dans le milieu de culture de la souche CCP. Par ailleurs, nous avons également montré que des souches de *C. cassiicola* dépourvues de gène de cassiicoline pouvaient néanmoins être pathogènes sur hévéa, confirmant l'hypothèse de l'existence d'autres effecteurs dont la nature chimique reste à déterminer.

Un autre résultat original de notre étude est la découverte de formes endophytiques de *C. cassiicola* chez l'hévéa dans une zone jusqu'à présent indemne de CLF. La caractérisation de ces isolats a permis de révéler la complexité du mode trophique de ce champignon chez l'hévéa. En effet, sur feuilles sénescents, ces isolats semblent capables d'avoir un développement de type saprophyte (ou pathogène de faible agressivité) ne faisant pas intervenir la cassiicoline.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence une importante diversité nucléotidique du gène codant pour la cassiicoline et l'existence d'au moins six isoformes protéiques différentes de cassiicoline permettant de grouper les isolats en classes toxiques. La concordance entre les groupes phylogénétiques et les classes toxiques suggère que ces toxines ont un rôle important en terme évolutif, probablement lié à l'adaptation des isolats à leur hôte. En particulier, nous formulons l'hypothèse que l'évolution vers (ou l'acquisition de) la forme toxinique Cas1, très agressive sur hévéa, aurait contribué à sélectionner un nouveau groupe de souches hautement compétitives sur hévéa. Mais d'autres groupes phylogénétiques, montrant une potentielle spécialisation pour l'hévéa, ont été mis en évidence parmi les souches dépourvues de gène de cassiicoline et dont l'effecteur est encore inconnu.

En conclusion, il sera nécessaire de tenir compte de la diversité des formes toxiques et de l'existence probable d'autres effecteurs, pour la mise-au-point d'un biotest visant à déterminer la sensibilité des clones d'hévéa à la CLF d'après leur sensibilité aux toxines produites par *C. cassiicola*.

## **II. Perspectives**

### **II. 1. Rôle de la cassiicoline dans la pathogénie de *C. cassicola* chez l'hévéa**

Pour progresser concernant la compréhension du rôle de la cassiicoline dans la pathogénie chez l'hévéa, une perspective à court terme sera de réaliser des mutants perte et gain de fonction par transformation génétique de *C. cassicola*. La perte de fonction de *Cas1* dans la souche pathogène CCP permettrait non seulement de valider d'un point de vue fonctionnel le rôle de *Cas1* mais également d'évaluer la part du deuxième effecteur éventuel dans la pathogénie. A l'inverse, l'insertion du gène *Cas1* dans une souche avirulente dépourvue de gène de cassiicoline permettrait, si cette souche devient effectivement pathogène, de valider incontestablement le rôle de *Cas1* dans la pathogénie sur hévéa. Ces souches mutées pourront également être testées sur d'autres plantes que l'hévéa pour analyser le caractère hôte-spécifique de *Cas1*.

Il faudra également poursuivre l'analyse de l'expression des gènes *Cas* pour vérifier lesquels sont fonctionnels et dans quelles conditions ils s'expriment. Pour cela, les études d'expression en condition d'inoculation contrôlées seront poursuivies, avec des temps d'analyse plus précoces (<24h post-inoculation) pour détecter d'éventuels pics d'expression transitoires associées aux phases très précoces de l'infection, mais aussi des points plus tardifs (sur feuilles sénescentes) pour tenir compte des différents modes trophiques du champignon.

L'analyse phylogénétique a révélé une probable spécialisation en fonction de l'hôte qui doit maintenant être confirmée sur un plus large panel de souches provenant d'hôtes diversifiés au sein d'une même région géographique. L'utilisation de marqueur(s) supplémentaire(s) tels que le gène d'actine (Dixon et al. 2009) pourrait permettre d'améliorer la définition des groupes phylogénétiques. L'étude des préférences clonales d'un plus grand nombre de souches issues de chaque groupe génétique, devraient permettre de confirmer l'hypothèse de la spécialisation par l'hôte des isolats et ainsi définir des profils de pathogénie types pour les différents groupes. Pour la poursuite des analyses de pathogénie, il conviendra de modifier notre protocole d'inoculation en raccourcissant le temps de lecture des symptômes à 5 jours maximum, afin de différencier les effecteurs de nécrotrophie d'autres effecteurs potentiellement associés à un développement de type saprophyte. En effet, les inoculations sont réalisées sur des feuilles en survie dont la sénescence s'accroît avec le temps, pouvant favoriser alors un développement de type saprophyte des souches inoculées.

### **II. 2. Quelles perspectives pour le contrôle de la maladie ?**

Nos résultats ont démontré que la cassiicoline ne suffit pas à expliquer la pathogénie de toutes les souches de *C. cassicola* sur hévéa et que plusieurs effecteurs pourraient agir conjointement. Le développement d'un biotest fiable et efficace représentatif de la pathogénie globale de *C. cassicola* sur l'hévéa nécessite de tenir compte de la diversité des effecteurs.

Pour cela, il est nécessaire de poursuivre la purification et la caractérisation fonctionnelle des différents effecteurs de pathogénie du champignon, à partir de souches représentatives des différents groupes phylogénétiques.

Deux approches peuvent être suivies pour isoler les autres isoformes de cassiicoline. Elles peuvent être purifiées à partir du filtrat de culture du champignon, à condition que le gène soit fonctionnel, exprimé *in vitro*, et que les protéines produites soient également fonctionnelles, en adaptant le protocole validé pour la cassiicoline Cas1. Elles peuvent également être produites sous forme recombinante par expression du gène *Cas* en système hétérologue, soit sous contrôle de son propre promoteur, soit sous contrôle du promoteur du gène *Cas1* ou encore sous le contrôle d'un promoteur inductible. L'expression en système hétérologue (*Pichia pastoris*) de toxines HSTs a été réalisée avec succès pour PtrToxB de *P. tritici-repentis* (Martinez et al. 2004) et SnTox3 de *S. nodorum* (Liu et al. 2009) tous deux pathogènes du blé. Pour les effecteurs autres que la cassiicoline, seule l'approche biochimique est envisageable mais la mise-au-point du protocole est plus empirique car la nature des nouveaux effecteurs est encore inconnue.

Nous proposons d'utiliser une méthode d'analyse par conductimétrie pour quantifier l'impact des toxines purifiées sur hévéa. La nécrose induite par la cassiicoline s'accompagne de dégradations membranaires générant des fuites d'électrolytes qu'il est possible de quantifier par conductimétrie. Cette méthode pourrait s'avérer plus simple à mettre en œuvre et plus précise que celle consistant à estimer la surface de nécrose d'induite. Ce biotest permettant de tester la sensibilité/résistance des clones vis-à-vis de chacune des isoformes de toxines isolées sera utile à la fois comme aide à la recommandation clonale et comme outil de sélection. Le criblage de la sensibilité d'individus issus de divers croisements ainsi que l'utilisation de marqueurs moléculaires devraient permettre de mieux comprendre le déterminisme génétique de la sensibilité/ résistance des clones d'hévéa vis-à-vis de chaque forme toxinique.

Les différents outils moléculaires développés au cours de cette thèse pourront être utiles également pour le diagnostic et le suivi épidémiologique de la maladie. Nous avons testé la possibilité de diagnostiquer la présence du champignon par PCR à partir d'ADN génomique provenant de lésions foliaires en utilisant des amorces spécifiques des ITS de *C. cassiicola*. Ces tests ont été faits à partir de lésions de feuilles symptomatiques de plusieurs clones d'hévéa provenant de plantations au Ghana et Côte d'Ivoire et se sont révélés efficaces pour détecter la présence de *C. cassiicola*. La qualité des séquences obtenues a montré que les amorces utilisées étaient très spécifiques du champignon. Compte tenu de la grande diversité de symptômes associée à la CLF en plantation, ce test PCR pourrait être d'une grande aide pour diagnostiquer la maladie.

Nous avons par ailleurs défini des amorces communes à tous les gènes *Cas* ainsi que des amorces spécifiques de chacune des isoformes de cassiicoline, ce qui devrait permettre de compléter le diagnostic en précisant à quelle classe toxinique appartient la souche détectée. Ce test PCR pourrait s'avérer très utile pour suivre l'évolution ou la migration des populations de *C. cassiicola* sans passer par une étape d'isolement des souches

Enfin, de nombreuses espèces de champignons ont été isolées à partir de feuilles asymptomatiques d'hévéa de plantation provenant du Brésil, parmi lesquelles des souches de *C. cassiicola*. Les résultats préliminaires obtenus suite à des tests *d'antagonisme* de croissance se sont montrés encourageants. Ces premiers tests *in vitro* doivent maintenant être complétés par des analyses *in planta* pour confirmer l'antagonisme. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies de lutte biologique.

*ANNEXE*

## Rubber tree endophytes as antagonists of the leaf pathogen

### *Corynespora cassiicola*



SOCFIN

Marine Déon<sup>1,2</sup>, Romina Gazis<sup>3</sup>, Ana Scomparin<sup>1</sup>, Thierry Leroy<sup>2</sup>, Patricia Roeckel-Drevet<sup>1</sup>, Priscila Chaverri<sup>3</sup>, Valérie Pujade-Renaud<sup>1,2</sup>

1. Clermont Universités, Université Blaise Pascal, UMR-PIAF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand Cedex, France.

2. CIRAD, UMR-DAP, TA A96/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5, France.

3. Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, 2112 Plant Sciences Building, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA

### Introduction

*Corynespora cassiicola* is an anamorphic ascomycete affecting a wide range of plants from tropical and subtropical countries [1]. In rubber tree (*Hevea brasiliensis*), it is the causative agent of *Corynespora* Leaf Fall Disease (CLFD) which is responsible for important yield losses in Asia and Africa, where most natural rubber is produced. This disease, however, is still absent from South American rubber plantations. Biocontrol may be an interesting method to fight the disease considering the important cost and ecological damages associated with chemical treatments at plantation scale. In this view, the search for fungi showing antagonism against *C. cassiicola* among the endophytes leaving in rubber tree tissues seems promising.

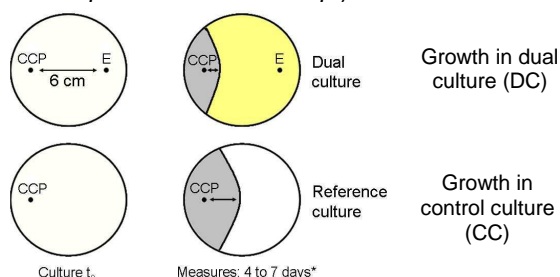
We analysed the antagonistic potential of 43 fungal endophytes (*Trichoderma*, *Pestalotiopsis* and *Colletotrichum* spp) isolated from rubber trees in Peru, against a virulent strain of *C. cassiicola*. *Pestalotiopsis* aff. *Palmarum* and *Trichoderma* *harzianum* were recently identified as the most represented fungal endophytes in wild rubber trees from Peru [2]. The antagonistic effect of *Trichoderma* sp. against specific fungal diseases has been well documented [3, 4], and *Pestalotiopsis* and *Colletotrichum* are known producers of bioactive substances with antifungal properties [5-7]. Therefore, endophytes from these three genera are good candidates for the identification of antagonists against *C. cassiicola*.

### Material & method

#### In vitro dual cultures

**CCP:** virulent *C. cassiicola* isolate from rubber tree, Philippines.

**E:** rubber tree endophyte (*Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* or *Trichoderma* sp.) from Peru.



**Culture medium:** Potato Dextrose Agar (PDA). Cultures were grown in the dark. *C. cassiicola* frontal growth was measured when the whole Petri dish was covered with mycelium (4 or 7 culture days depending on the endophyte growth speed). Control cultures were *C. cassiicola* alone. All cultures were performed in triplicate.

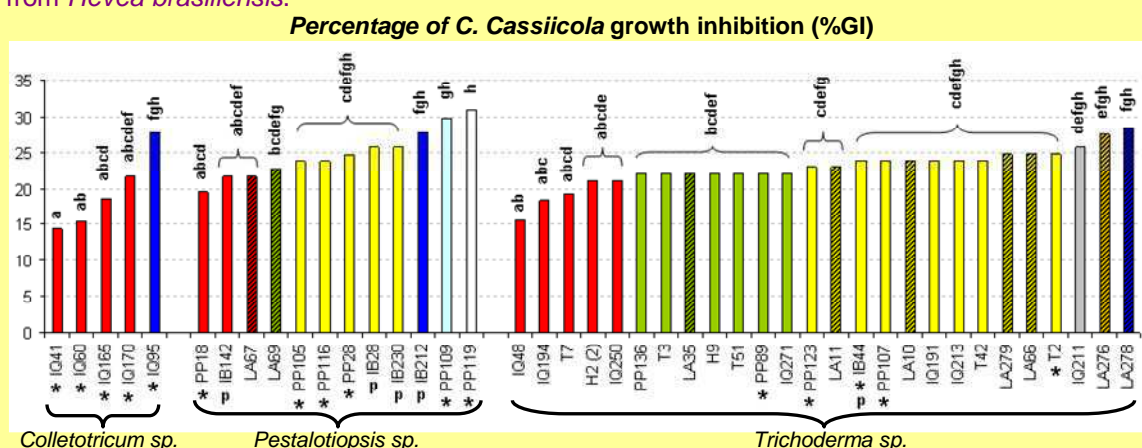
$$\% \text{ of growth inhibition} = 100 - [(DC/CC) * 100]$$



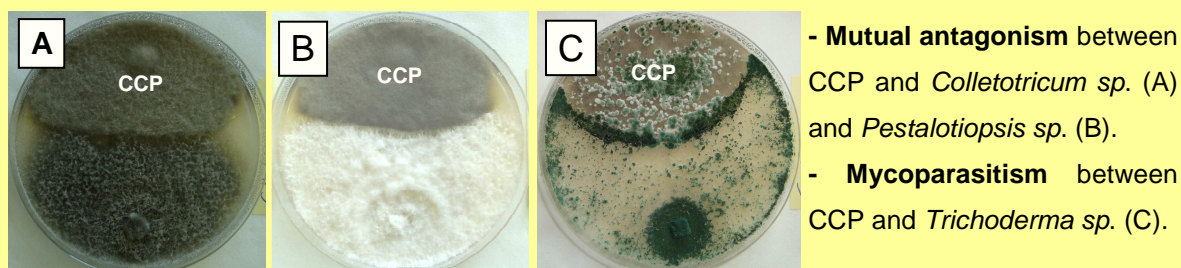
**Fig. 1: CLF disease symptoms on rubber tree**

## Antagonism tests

**Fig. 2: *C. cassiicola* growth inhibition percentage (%GI) in dual culture with rubber tree endophytes.** %GI was calculated from the mean of 3 replicates, comparing dual cultures to reference cultures. Statistical analysis was performed on the 43 combined isolates, using Fisher's least significant difference (LSD) procedure ( $p \geq 0,05$ ). Asterisks (\*) correspond to isolates from leaves and others from sapwood; "p" corresponds to isolates from planted hevea trees and others from wild hevea; hatching indicates isolates from *Hevea guianensis* and others from *Hevea brasiliensis*.



**Fig. 3 : Dual-cultures photos.**



## Results

- Growth inhibition** of *C. cassiicola* (15 to 30%) was observed with all endophytes, with:
  - significant differences depending on the endophyte species within each genera
  - no significant correlation with the endophyte origin, whether host species (*H. brasiliensis* vs *H. guianensis*), tissue (leaves vs sapwood) or domestication (planted vs wild) (this would need confirmation with larger populations).
- Mycoparasitism** was observed with *Trichodermas* sp only

1. Dixon, L.J., *et al.*, Phytopathol., 2009. **99**(9): p. 1015-1027. 2. Gazis, R. and P. Chaverri, Fungal Ecology, 2010. **3**(3): p. 240-254. 3. De Souza, J.T. *et al.*, Biological Control, 2008. **46**(1): p. 36-45. 4. Hanada, R.E. *et al.*, Mycol Res, 2008. **112**(Pt 11): p. 1335-43. 5. Inácio, M.L. *et al.*, Biochemical Systematics and Ecology, 2006. **34**(11): p. 822-824. 6. Tejesvi, M.V. *et al.*, Fungal Diversity, 2007. **24**: p. 37-54. 7. Li, E. *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008. **16**(17): p. 7894-7899.

## Conclusion

*Trichoderma* sp are good candidates for the biocontrol of *C. cassiicola* considering their strong parasitism on this pathogen. *Colletotrichum* and *Pestalotiopsis* have no parasitic potential on *C. cassiicola* but they may produce soluble or volatile compounds able to limit *C. cassiicola* growth.





*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*



- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AHJ, Riley RT (1994) Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiology* 106 (3):1085–1093
- Abeysekara N, Friesen T, Keller B, Faris J (2009) Identification and characterization of a novel host–toxin interaction in the wheat *Stagonospora nodorum* pathosystem. *Theoretical and Applied Genetics* 120 (1):117-126. doi:10.1007/s00122-009-1163-6
- Abraham PD, Wycherley PR, Pakianathan SW (1968) Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 2-chloroethane-phosphonic acid. *Journal of Rubber Research* 20:291-305
- Ade J, DeYoung BJ, Golstein C, Innes RW (2007) Indirect activation of a plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7):2531-2536
- Aducci P, Marra M, Fogliano V, Fullone MR (1995) Fusicoccin receptors: perception and transduction of the fusicoccin signal. *Journal of Experimental Botany* 46 (10):1463-1478. doi:10.1093/jxb/46.10.1463
- Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL (2004) Host-Parasite Coevolutionary Conflict Between *Arabidopsis* and Downy Mildew. *Science* 306 (5703):1957-1960. doi:10.1126/science.1104022
- Amaiike S, Ozga JA, Basu U, Strelkov SE (2008) Quantification of ToxB gene expression and formation of appressoria by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* differing in pathogenicity. *Plant Pathology* 57 (4):623-633. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01821.x
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier J-M, Quévillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard V, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Collémare J, Cotton P, Danchin EG, Da Silva C, Gautier A, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Güldener U, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira C, Kretschmer M, Lappartient A, Leroy M, Levis C, Mauceli E, Neuvéglise C, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rascle C, Schumacher J, Ségurens B, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, Yandava C, Yarden O, Zeng Q, Rollins JA, Lebrun M-H, Dickman M (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7 (8):e1002230
- Anderson JA, Effertz RJ, Faris JD, Franc L, Meinhardt SW, Gill BS (1999) Genetic Analysis of Sensitivity to a *Pyrenophora tritici-repentis* Necrosis-Inducing Toxin in Durum and Common Wheat. *Phytopathology* 89 (4):293-297. doi:10.1094/phyto.1999.89.4.293
- Andrieu RM, Ciuffetti LM (2011) *Pyrenophora bromi*, Causal Agent of Brownspot of Bromegrass, Expresses a Gene Encoding a Protein with Homology and Similar Activity to Ptr ToxB, a Host-Selective Toxin of Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24 (3):359-367. doi:doi:10.1094/MPMI-06-10-0142

- Andrie RM, Pandelova I, Ciuffetti LM (2007) A Combination of Phenotypic and Genotypic Characterization Strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* Race Identification. *Phytopathology* 97 (6):694-701. doi:doi:10.1094/PHYTO-97-6-0694
- Andrie RM, Schoch CL, Hedges R, Spatafora JW, Ciuffetti LM (2008) Homologs of ToxB, a host-selective toxin gene from *Pyrenophora tritici-repentis*, are present in the genome of sister-species *Pyrenophora bromi* and other members of the Ascomycota. *Fungal Genetics and Biology* 45 (3):363-377
- Archer B, Cockbain E (1969) New aspects of rubber biosynthesis.181-196
- Archer BL, Audley BG, McSweeney GP, Hong TC (1969) Studies on the composition of latex serum and bottom fraction. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* 21:560– 569
- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JIB, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Böhme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PRJ (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21):7766-7771. doi:10.1073/pnas.0500113102
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15649-15654
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173 (4):808-816. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x
- Atan S, Hamid NH (2003) Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *Journal of Rubber Research* 6 (1):58-64
- Awoderu VA (1969) A New leaf spot of para rubber (*Hevea brasiliensis*) in Nigeria. *Plant Disease Reporter* 53:406-408
- Axtell MJ, Staskawicz BJ (2003) Initiation of RPS2-Specified Disease Resistance in *Arabidopsis* Is Coupled to the AvrRpt2-Directed Elimination of RIN4. *Cell* 112 (3):369-377
- Ballance GM, Lamari L, Bernier CC (1989) Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35:203-213
- Ballance GM, Lamari L, R Kowatsch R, Bernier CC (1996) Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology On-Line* [<http://www.bspp.org.uk/mppol/>] 1996/1209ballance
- Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, Roumestand C, de Lamotte F (2007) Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *Journal of Molecular Biology* 367 (1):89-101
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340 (4):783-795

- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60 (1):379-406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bonas U, Conrads-Strauch J, Balbo I (1993) Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Molecular and General Genetics* 238 (1):261-269. doi:10.1007/bf00279555
- Bonos SA, Wilson MM, Meyer WA, Funk CR (2005) Suppression of Red Thread in Fine Fescues Through Endophyte-Mediated Resistance. *Applied Turfgrass Science* doi:10.1094/ATS-2005-0725-01-RS
- Brandwagt BF, Kneppers TJA, Nijkamp HJJ, Hille J (2002) Overexpression of the Tomato *Asc-1* Gene Mediates High Insensitivity to AAL Toxins and Fumonisin B1 in Tomato Hairy Roots and Confers Resistance to *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* in *Nicotiana umbratica* Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (1):35-42. doi:10.1094/mpmi.2002.15.1.35
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FLW, Laurent PL, Kneppers TJA, Hille J, Nijkamp HJJ (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9):4961-4966. doi:10.1073/pnas.97.9.4961
- Breton F (1997) Réactions de défense dans l'interaction *Hevea brasiliensis/Corynespora cassiicola* et implication d'une toxine dans le déterminisme de la réponse clonale. Université Montpellier 2, Montpellier
- Breton F, Garcia D, Sanier C, Eschbach JM, d'Auzac J (1997a) L'interaction entre *Corynespora cassiicola* et *Hevea brasiliensis*. *Plantations Recherche Développement* 4:322-335
- Breton F, Sanier C, d'Auzac J (1997b) Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *Journal of Plant Physiology* 151:595-602
- Breton F, Sanier C, d'Auzac J (2000) Role of Cassicolin, a Host-Selective Toxin, in Pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, Causal Agent of a Leaf Fall Disease of *Hevea*. *Journal of Rubber Research* 3 (2):115-128
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A Single Amino Acid Difference Distinguishes Resistant and Susceptible Alleles of the Rice Blast Resistance Gene *Pi-ta*. *The Plant Cell* 12:2033-2045
- Burch-Smith TM, Schiff M, Caplan JL, Tsao J, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP (2006) A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors. *PLoS Biology* 5 (3):e58. doi:10.1371/journal.pbio.0050068
- Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL (1997) Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* 114:1-7
- Cai L, Ji K-F, Hyde K (2006) Variation between freshwater and terrestrial fungal communities on decaying bamboo culms. *Antonie van Leeuwenhoek* 89 (2):293-301. doi:10.1007/s10482-005-9030-1
- Calendini F, Martin JF (2005) PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup\* Dos software.

- Catanzariti A-M, Dodds PN, Ve T, Kobe B, Ellis JG, Staskawicz BJ (2009) The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (1):49-57. doi:10.1094/mpmi-23-1-0049
- Chaparro DF, Rosas DC, Varela A (2009) Isolation of wood-decaying fungi and evaluation of their enzymatic activity (Quindio, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología* 26 (4):238-243
- Chee KH Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on *Hevea* rubber. In: *Proceedings of the IRRDB Symposium*, Thailand, Chian Mai, 1987. pp 6-17
- Chee KH (1988) Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on hevea rubber. *Journal of Natural Rubber Research* 3:21-29
- Chee KH (1990) Rubber diseases and their control. *Review of Plant Pathology* 69 (7):423-430.
- Chen Z, Nunes MA, Silva MC, Rodrigues CJ (2004) Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia* 96 (6):1199-1208
- Cheng CM, Wang RS, Jiang JS (2007) Variation of soil fertility and carbon sequestration by planting *Hevea brasiliensis* in Hainan Island, China. *Journal of Environmental Sciences* 19:348-352
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124 (4):803-814
- Chisholm ST, Dahlbeck D, Krishnamurthy N, Day B, Sjolander K, Staskawicz BJ (2005) Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6):2087-2092. doi:10.1073/pnas.0409468102
- Chu CG, Faris J, Xu S, Friesen T (2010) Genetic analysis of disease susceptibility contributed by the compatible *Tsn1*–*SnToxA* and *Snn1*–*SnTox1* interactions in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem. *Theoretical and Applied Genetics* 120 (7):1451-1459. doi:10.1007/s00122-010-1267-z
- Ciuffetti LM, Franc L, Ballance GM, Bockus WW, Lamari L, Meinhardt SW, Rasmussen JB (1998) Standardization of toxin nomenclature in the *Pyrenophora tritici-repentis*/ Wheat interaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20:421-424
- Ciuffetti LM, Manning VA, Pandelova I, Betts MF, Martinez JP (2010) Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *New Phytologist* 187 (4):911-919. doi:NPH3362 [pii] 10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x
- Ciuffetti LM, Tuori RP, Gaventa JM (1997) A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell* 9 (2):135-144. doi:10.1105/tpc.9.2.135 9/2/135 [pii]
- Clarke BB, White JF, Hurley RH, Torres MnS, Sun S, Huff DR (2006) Endophyte-Mediated Suppression of Dollar Spot Disease in Fine Fescues. *Plant Disease* 90 (8):994-998. doi:10.1094/pd-90-0994
- Collado J, Platas G, Gonzalez I, Pelaez F (1999) Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist* 144 (3):525-532
- Compagnon P (1986) Le caoutchouc naturel: biologie, culture, production. Maisonneuve & Larose edn., Paris

- Curtis MJ, Wolpert TJ (2004) The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. *The Plant Journal* 38 (2):244-259. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02040.x
- d'Auzac J (1965) Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biogénèse du caoutchouc. Paris.
- d'Auzac J (1982) A plant vacuolar system: the lutoïds from *Hevea brasiliensis* latex. *Physiologie Végétale* 20:311-331
- d'Auzac J (1996) L'oxygène "toxique": une défense contre les pathogènes. *Plantations, Recherche, Développement* 3:153-170
- d'Auzac J, Prévôt JC, Jacob JL (1995) What's new about lutoïds? a vacuolar system model from *Hevea* latex. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:765-777
- d'Auzac J, Ribailier D (1969) L'éthylène, un nouveau stimulant de la production de latex chez l'*Hevea brasiliensis*. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences Série D* 268:3046-3049
- Dalpe Y (2005) Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection* 86:53-59
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411 (6839):826-833
- Darmono TW, Darussamin A, Pawirosoemardjo S Variation among isolates of *Corynespora cassiicola* associated with *Hevea brasiliensis* in Indonesia. In: Proceeding workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber, Medan, Indonesia, 16-17 December 1996. pp 79-91
- Daub ME, Chung KR (2009) *Plant Relationships*, 2nd Edition. The Mycota V. H. Deising edn., Berlin Heidelberg
- Daub ME, Ehrenschaft M (2000) THE PHOTOACTIVATED CERCOSPORA TOXIN CERCOSPORIN: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. *Annual Review of Phytopathology* 38 (1):461-490. doi:doi:10.1146/annurev.phyto.38.1.461
- Daub ME, Herrero S, Chung KR (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiology Letters* 252:197-206
- Day B, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (2006) NDR1 Interaction with RIN4 Mediates the Differential Activation of Multiple Disease Resistance Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2782-2791
- de Jonge R, Peter van Esse H, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ (2010) Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* 329 (5994):953-955. doi:10.1126/science.1190859
- de Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Thai R, Poncet J, Bieysse D, Breton F, Pujade-Renaud V (2007) Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *Journal of Chromatography B* 849 (1-2):357-362
- De Souza JT, Bailey BA, Pomella AWV, Erbe EF, Murphy CA, Bae H, Hebbar PK (2008) Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control* 46 (1):36-45



- Delabarre M, Serier JB (eds) (1995) L'hévéa. Maisonneuve et Larose edn, Paris
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck DI, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in *Arabidopsis* Seedlings. *Molecular Plant* 1 (3):423-445. doi:10.1093/mp/ssn019
- Déon M, Bourré Y, Gimenez S, Berger A, Bieysse D, de Lamotte F, Poncet J, Roussel V, Bonnot F, Oliver G, Franchel J, Seguin M, Leroy T, Roeckel-Drevet P, Pujade-Renaud V (2012a) Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science* 185-186 (0):227-237. doi:10.1016/j.plantsci.2011.10.017
- Déon M, Scomparin A, Tixier A, Mattos C, Leroy T, Seguin M, Roeckel-Drevet P, Pujade-Renaud V (2012b) First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity* 54 (1):87-99. doi:10.1007/s13225-012-0169-6
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin Sp, Marco Y (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13):8024-8029. doi:10.1073/pnas.1230660100
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K, Datnoff LE (2009) Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99 (9):1015-1027. doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (23):8888-8893. doi:10.1073/pnas.0602577103
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 Avirulence Genes Are Expressed in Haustoria and Their Products Are Recognized inside Plant Cells. *The Plant Cell* 16 (3):755–768
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist* 183 (4):993-1000. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02922.x
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, Zhang X, Tyler BM (2008a) RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *The Plant Cell* 20 (7):1930-1947. doi:10.1105/tpc.107.056093
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2011) Geneious v5.4, available from <http://www.geneious.com/>.
- Duhoux E, Nicole M (2004) Atlas de Biologie Végétale. Associations et interactions chez les plantes. Paris

- Duke SO, Dayan FE (2011) Modes of Action of Microbially-Produced Phytotoxins. *Toxins* 3:1038-1064
- Dung PT, Hoan NT *Corynespora* leaf fall on rubber in Vietnam; a New record. In: Proceeding of IRRDB Symposium, Haicau, China, 1999. pp 273–275
- Effertz RJ, Meinhardt SW, Anderson JA, Jordahl JG, Franc LJ (2002) Identification of a Chlorosis-Inducing Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the Chromosomal Location of an Insensitivity Locus in Wheat. *Phytopathology* 92 (5):527-533. doi:10.1094/phyto.2002.92.5.527
- Erickson FL, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C, Baker B (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *The Plant Journal* 18 (1):67-75. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00426.x
- Faris JD, Zhang Z, Lu H, Lu S, Reddy L, Cloutier S, Fellers JP, Meinhardt SW, Rasmussen JB, Xu SS, Oliver RP, Simons KJ, Friesen TL (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1004090107
- Farr DF, Rossman AY (2011) Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, from /fungaldatabases/
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fernando THPS, Jayasinghe CK, Wijesundera RLC, Siriwardana D (2009) Variability of *Hevea* isolates of *Corynespora cassiicola* from Sri Lanka. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116 (3):1861-3829
- Fisher PJ, Petrini O (1992) Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 120:137-143
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust: its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685
- Frey-Wissling A (1932) Studies on the dilution reaction and the movement of the latex of *Hevea brasiliensis* during tapping. *Arch Rubbercult* 16:285-327
- Friesen TL, Faris JD (2004) Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 109 (3):464-471. doi:10.1007/s00122-004-1678-9
- Friesen TL, Faris JD, Solomon PS, Oliver RP (2008a) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology* 10 (7):1421-1428. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01153.x
- Friesen TL, Meinhardt SW, Faris JD (2007) The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *The Plant Journal* 51 (4):681-692. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03166.x
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics* 38 (8):953-956

- Friesen TL, Zengcui Zhang Z, Solomon PS, Oliver RP, Faris JD (2008b) Characterization of the Interaction of a Novel *Stagonospora nodorum* Host-Selective Toxin with a Wheat Susceptibility Gene. *Plant Physiology* 146 (2):682-693
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 263 (34):18545-18552
- Gamba FM, Lamari L, Brülé-Babel AL (1998) Inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexaploid wheats. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20 (4):401-407. doi:10.1080/07060669809500411
- Garcia D (1997) Rapport bibliographique: la biologie, la diversité et les méthodes de lutte contre deux parasites foliaires de l'*Hevea*: *Corynespora cassiicola* et *Colletotrichum gloesporioides*.
- Gaulin E, Madoui MA, Bottin A, Jacquet C, Mathé C, Couloux C, Wincker P, Dumas B (2008) Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: New Oomycete Putative Pathogenicity Factors and Metabolic Pathways. *Plos ONE* 3 (3):e1723. doi:10.1371/journal.pone.0001723
- Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* 3 (3):240-254
- Germain H, Séguin A (2011) Innate immunity: has poplar made its BED? *New Phytologist* 189 (3):678-687. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03544.x
- Gidrol X, Chrestin H, Tan HL, Kush A (1994) Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) is involved in the coagulation of latex. *Journal of Biological Chemistry* 269:9278-9283
- Gohbara M, Kosuge Y, Yamaaki S, Kimura Y, Suzuki A, Tamura S (1978) Isolation, structures and biological activities of colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. *Agricultural Biology and Chemistry* 42:1037-1043
- Gomez J, Moir G The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. In: RRI M (ed) Malaysian Rubber research Development Board, Kuala lumpur, 1979.
- Gomez JB Comparative ultracytology of young and mature latex vessels in *Hevea brasiliensis*. In: RRI M (ed) International Rubber conference, Kuala Lumpur, malaysia, 1976.
- Gond SK, Verma VC, Kumar A, Kumar V, Kharwar RN (2007) Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:1371-1375
- Goudet C, Milat M-L, Sentenac H, Thibaud J-B (2000) Beticolins, Nonpeptidic, Polycyclic Molecules Produced by the Phytopathogenic Fungus *Cercospora beticola*, as a New Family of Ion Channel-Forming Toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (2):203-209. doi:10.1094/mpmi.2000.13.2.203
- Grant M, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes R, Dangl J (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269 (5225):843-846. doi:10.1126/science.7638602

- Guyot J, Ntawanga Omanda E, Ndoutoume A, Mba Otsaghe A, Enjalric F, Ngoua Assoumou HG (2001) Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber on epidemic development and rubber production. *Crop Protection* 20:581-590
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AMV, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JIB, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grunwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu C-H, Huitema E, Jeong D-H, Jones AME, Jones JDG, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, MacLean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJG, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzon A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJI, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PRJ, Whisson SC, Judelson HS, Nusbaum C (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461 (7262):393-398
- Hallé F, Martin R (1968a) Etude de la croissance rythmique chez l'Hevea (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg., Euphorbiacées, Crotonoïdées). *Adansonia* 8:475-503
- Hallé F, Martin R (1968b) Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) (Müll. Arg., Euphorbiacées, crotonoïdées). *Adansonia* 8:475-503
- Halloin JM, De Zoeten GA, Gaard G, Walker JC (1970) The effects of tentoxin on chlorophyll synthesis and plastid structure in cucumber and cabbage. *Plant Physiology* 45 (3):310-314
- Hanada RE, Pomella AWW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2008) Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology* 114 (11-12):901-910
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (2):115-122. doi:10.1094/mpmi-22-2-0115
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising HB (2011) When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168 (1):51-62
- Hou S, Yang Y, Wu Y, Zhang C (2011) Plant immunity. Evolutionary insights from PBS1, Pto and RIN4. *Plant Signaling & Behavior* 6 (6):794-799
- Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken FLW, Rep M (2009) The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* 58 (6):970-978. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x
- Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24):11281-11284

- Huang H-K, Liu C-E, Liou J-H, Hsiue H-C, Hsiao C-H, Hsueh P-R (2009) Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. *Journal of Infection* 60 (2):188-190
- Hyde KD, Ho WH, McKenzie EHC, Dalisay T (2001) Saprobic fungi on bamboo culms. *Fungal Diversity* 7:35-48
- Inácio ML, Silva GH, Teles HL, Trevisan HC, Cavaleiro AJ, Bolzani VdS, Young MCM, Pfenning LH, Araujo AR (2006) Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34 (11):822-824
- Ismail H, Jeyanayagi I Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of *Hevea*. In: Proceedings of IRRDB Symposium 1999, 1999. Hainan Publishing House, pp p263-272
- Jayasinghe CK (2000) *Corynespora* Leaf Fall: the most challenging rubber disease in Asian and African continents. *Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 42:56-64
- Jayasinghe CK (2003) *Corynespora* Leaf Fall and future of the leading rubber clones in the world. *Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 44:5-11
- Jayasinghe CK, Silva WPK Current status of *Corynespora leaf fall* in Sri Lanka. In: Proceeding on the Workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease, Medan, Indonesia, 1996. pp 3-5
- Jayasinghe CK, Silva WPK, Wettasinghe DS (1998) *Corynespora cassiicola*: a fungal pathogen with diverse symptoms on *Hevea* rubber. *Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 39:1-5
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valet B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO journal* 19 (15):4004-4014
- Jinji P, Zhang X, Qi Y, Xie Y, Zhang H, Zhang H (2007) First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China. *Australasian Plant Disease Notes* 2:35–36
- Johal G, Briggs S (1992) Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* 258 (5084):985-987. doi:10.1126/science.1359642
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444 (7117):323-329
- Junqueira NTV, Gasparotto L, Moraes VHF, Silva HM, Lim TM New diseases caused by virus, fungi and also bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. In: Proceeding of the regional conference on plant quarantine support for agricultural development, Kuala Lumpur, Malaysia, 10-12 December 1985. pp 253–260
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (29):11086-11091. doi:10.1073/pnas.0508882103
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, Lawrence CB, Shan W, Tyler BM (2010) External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* 142 (2):284-295
- Kamoun S (2007) Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* 10:358-365

- Kämper J, Kahmann R, Bolker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HAB, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho ECH, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes H-W, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444 (7115):97-101
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B (2007) Roles for Rice Membrane Dynamics and Plasmodesmata during Biotrophic Invasion by the Blast Fungus. *The Plant Cell* 19:706-724
- Keren N, Ohkawa H, Welsh EA, Liberton M, Pakrasi HB (2005) Psb29, a Conserved 22-kD Protein, Functions in the Biogenesis of Photosystem II Complexes in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17 (10):2768-2781
- Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park SY, Czymmek K, Kang S, Valent B (2010) Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. *Plant Cell* 22 (4):1388-1403
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D (2005) Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* 121 (5):749-759
- Kim YM, Strelkov SE (2007) Heterologous expression and activity of Ptr ToxB from virulent and avirulent isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29 (3):232-242. doi:10.1080/07060660709507465
- Kingsland GC (1985a) Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the Republic of the Seychelles. *Acta Horti* (ISHS) 153:229-230
- Kingsland GC (1985b) Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the Republic of the Seychelles. *Acta Horticulturae* (ISHS) 153:229-230.
- Kodsueb R, MacKenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD (2008) Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Diversity* 30:37-53
- Koenning SR, Creswell TC, Dunphy EJ, Sikora EJ, Mueller JD (2006) Increased Occurrence of Target Spot of Soybean Caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. *Plant Disease* 90 (7):974-974. doi:doi:10.1094/PD-90-0974C
- Kohler A, Rinaldi C, Duplessis S, Baucher M, Geelen D, Duchaussoy F, Meyers B, Boerjan W, Martin F (2008) Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology* 66 (6):619-636. doi:10.1007/s11103-008-9293-9
- Kumar D, Hyde K (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17:69-90

- Lakshmanan P, Jeyarajan R, Vidhyasekaran P (1990) A boll rot of cotton caused by *Corynespora Cassiicola* in Tamil Nadu, India. *Phytoparasitica* 18 (2):171-173. doi:10.1007/bf02981234
- Lamari L, Strelkov SE, Yahyaoui A, Orabi J, Smith RB (2003) The Identification of Two New Races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the Host Center of Diversity Confirms a One-to-One Relationship in Tan Spot of Wheat. *Phytopathology* 93 (4):391-396. doi:10.1094/phyto.2003.93.4.391
- Lana T, Azevedo J, Pomella A, Monteiro R, Silva C, Araujo W (2011) Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are distinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genetics and Molecular Research* 10 (1):326-334
- Laugé R, Goodwin PH, De Wit PJGM, Joosten MHAJ (2000) Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *The Plant Journal* 23 (6):735-745. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00843.x
- Le Guen V (2008) Exploration de la diversité des résistances génétiques à la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) par cartographie et génétique d'association au sein de populations naturelles. Université Montpellier II, Montpellier
- Le Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M (2003) Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight ( *Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics* 108 (1):160-167. doi:10.1007/s00122-003-1407-9
- Lee HI, Raikhel NV (1995) Prohevein is poorly processed but shows enhanced resistance to a chitin-binding fungus in transgenic tomato plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28:743– 750
- Lee S, Melnik V, Taylor J, Crous P (2004) Diversity of saprobic hyphomycetes on *Proteaceae* and *Restionaceae* from South Africa. *Fungal Diversity* 17:91-114
- Lehto T, Zwiazek J (2011) Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21 (2):71-90. doi:10.1007/s00572-010-0348-9
- Lespinasse D, Grivet L, Troispoux V, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M (2000a) Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (6):975-984. doi:10.1007/s001220051379
- Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M (2000b) A saturated genetic linkage map of rubber tree ( *Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (1):127-138. doi:10.1007/s001220050018
- Li E, Jiang L, Guo L, Zhang H, Che Y (2008) Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 (17):7894-7899
- Li H-Y, Yang G-D, Shu H-R, Yang Y-T, Ye B-X, Nishida I, Zheng C-C (2006) Colonization by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus versiforme* Induces a Defense Response Against the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* in the Grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), Which Includes Transcriptional Activation of the Class III Chitinase Gene *VCH3*. *Plant and Cell Physiology* 47 (1):154-163. doi:10.1093/pcp/pci231

- Li W, Wang B, Wu J, Lu G, Hu Y, Zhang X, Zhang Z, Zhao Q, Feng Q, Zhang H, Wang Z, Wang G, Han B, Wang Z, Zhou B (2009) The *Magnaporthe oryzae* Avirulence Gene *AvrPiz-t* Encodes a Predicted Secreted Protein That Triggers the Immunity in Rice Mediated by the Blast Resistance Gene *Piz-t*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (4):411-420. doi:10.1094/mpmi-22-4-0411
- Liu Z, Faris JD, Oliver RP, Tan K-C, Solomon PS, McDonald MC, McDonald BA, Nunez A, Lu S, Rasmussen JB, Friesen TL (2009) SnTox3 Acts in Effector Triggered Susceptibility to Induce Disease on Wheat Carrying the *Snn3* Gene. *PLoS Pathogens* 5 (9):e1000581
- Liu Z, Friesen TL, Ling H, Meinhardt SW, Oliver RP, Rasmussen JB, Faris JD (2006) The Tsn1-ToxA interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system. *Genome* 49 (10):1265-1273. doi:doi:10.1139/g06-088
- Liu ZH, Faris JD, Meinhardt SW, Ali S, Rasmussen JB, Friesen TL (2004a) Genetic and Physical Mapping of a Gene Conditioning Sensitivity in Wheat to a Partially Purified Host-Selective Toxin Produced by *Stagonospora nodorum*. *Phytopathology* 94 (10):1056-1060. doi:10.1094/phyto.2004.94.10.1056
- Liu ZH, Friesen TL, Rasmussen JB, Ali S, Meinhardt SW, Faris JD (2004b) Quantitative Trait Loci Analysis and Mapping of Seedling Resistance to *Stagonospora nodorum* Leaf Blotch in Wheat. *Phytopathology* 94 (10):1061-1067. doi:10.1094/phyto.2004.94.10.1061
- Liyanage AS, Jayasinghe CK, Liyanage NIS, Jayaratne AHR (1986a) *Corynespora* Leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) - A new report. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 65:47-50
- Liyanage NIS, Liyanage AS (1986b) A study on the production of toxin in *Corynespora cassiicola*. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 65:51-53
- Lorang JM, Carkaci-Salli N, Wolpert TJ (2004) Identification and Characterization of Victorin Sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (6):577-582. doi:10.1094/mpmi.2004.17.6.577
- Lorang JM, Sweat TA, Wolpert TJ (2007) Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (37):14861-14866. doi:10.1073/pnas.0702572104
- Ma W, Guttman DS (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 11 (4):412-419
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. *Cell* 108 (6):743-754
- Manning VA, Chu AL, Scofield SR, Ciuffetti LM (2010) Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. *New Phytologist* 187 (4):1034-1047. doi:NPH3363 [pii] 10.1111/j.1469-8137.2010.03363.x
- Manning VA, Chu AL, Steeves JE, Wolpert TJ, Ciuffetti LM (2009) A Host-Selective Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA, Induces Photosystem Changes and Reactive Oxygen



- Species Accumulation in Sensitive Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (6):665-676. doi:10.1094/mpmi-22-6-0665
- Manning VA, Ciuffetti LM (2005) Localization of Ptr ToxA Produced by *Pyrenophora tritici-repentis* Reveals Protein Import into Wheat Mesophyll Cells. *Plant Cell* 17 (11):3203-3212
- Manning VA, Hamilton SM, Karplus PA, Ciuffetti LM (2008) The Arg-Gly-Asp-Containing, Solvent-Exposed Loop of Ptr ToxA Is Required for Internalization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (3):315-325. doi:10.1094/mpmi-21-3-0315
- Manning VA, Hardison LK, Ciuffetti LM (2007) Ptr ToxA Interacts with a Chloroplast-Localized Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (2):168-177. doi:10.1094/mpmi-20-2-0168
- Martin G, Brommonschenkel S, Chunwongse J, Frary A, Ganai M, Spivey R, Wu T, Earle E, Tanksley S (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262 (5138):1432-1436. doi:10.1126/science.7902614
- Martinez JP, Oesch NW, Ciuffetti LM (2004) Characterization of the Multiple-Copy Host-Selective Toxin Gene, ToxB, in Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (5):467-474. doi:doi:10.1094/MPMI.2004.17.5.467
- Martinez JP, Ottum SA, Ali S, Franc LJ, Ciuffetti LM (2001) Characterization of the ToxB Gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (5):675-677. doi:10.1094/mpmi.2001.14.5.675
- Mattos CRR, Garcia D, Pinard F, Le Guen V (2003) Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 28 (5):502-507
- Meeley RB, Walton JD (1991) Enzymatic Detoxification of HC-toxin, the Host-Selective Cyclic Peptide from *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiology* 97 (3):1080-1086. doi:10.1104/pp.97.3.1080
- Melotto M, Underwood W, He SY (2008) Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46 (1):101-122. doi:doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959
- Meronuck RA, Steele JA, Mirocha CJ, Christensen CM (1972) Tenuazonic Acid, a Toxin Produced by *Alternaria alternata*. *Applied Microbiology* 23 (3):613-617
- Meyers BC, Kozic A, Griego A, Kuang H, Micheltmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15 (4):809-834
- Mindrinis M, Katagiri F, Yu G-L, Ausubel FM (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78 (6):1089-1099
- Miransari M (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. *Archives of Microbiology* 193 (2):77-81. doi:10.1007/s00203-010-0657-6
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49):19613-19618. doi:10.1073/pnas.0705147104
- Mostert L, Crous PW, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52 (1):46-58

- Nagy ED, Bennetzen JL (2008) Pathogen corruption and site-directed recombination at a plant disease resistance gene cluster. *Genome Research* 18 (12):1918-1923. doi:10.1101/gr.078766.108
- Navarre DA, Wolpert TJ (1995) Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. *Plant Cell* 7 (4):463-471
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Newsam A (1960) Plant Pathology Division Report. Rubber Research Institute of Malaysia, p63-70,
- Nghia N, Kadir J, Sunderasan E, Puad Abdullah M, Malik A, Napis S (2008) Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166 (4):189-201
- Noda J, Brito N, González C (2010) The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology* 10:38
- Nugawela A, Liyanage NIS, Liyanage AS, Aluthhewage RK (1989) Influence of infection by *Corynespora cassiicola* on carbon dioxide assimilation rate in *Hevea* leaves. *Journal of Natural Rubber Research* 4(4):233-238
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198 (1):249-266. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x
- Okane I, Srikitkulchai P, Toyama K, Laessle T, Sivichai S, Hywel-Jones N, Nakagiri A, Potacharoen W, Suzuki K-i (2008) Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience* 49 (6):359-372. doi:10.1007/s10267-008-0440-6
- Okhuoya JA (1986) Seasonal and diurnal changes of two leaf pathogens of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) in the air of Iyanomo, Nigeria. *Acta Mycologica* 12:65-67
- Okoma K, Dian K, Allou D, Sangare A (2009) Etude de la sensibilité des clones d'*Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) à l'encoche sèche. *Sciences & Nature* 6 (1):17-26
- Oliveira RR, Vida JB, Tessmann DJ, Aguiar BdM, Caixeta MP, Barboza AL (2007) Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa Phytopathologica* 33:297-299
- Oliveira RR, Vida JB, Tessmann DJ, Aguiar BM, Caixeta MP (2006) Reação de híbridos de pepino para cultivo protegido a isolados de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatologia Brasileira* 31:509-512
- Oliver RP, Ipcho SVS (2004) Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology* 5 (4):347-352. doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00228.x
- Oliver RP, Solomon PS (2010) New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current Opinion in Plant Biology* 13 (4):415-419
- Onesirosan P, Mabuni CT, Durbin RD, Morin RB, Righ DH, Arny DC (1975) Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiological Plant Pathology* 5:289-295

- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menéndez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. The Plant Journal 38 (2):285-297. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02047.x
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, C MEH, Hyde KD (2004) Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? Fungal Diversity 16:131-140
- Photita W, Taylor P, Ford R, Hyde K, Lumyong S (2005) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in thailand. Fungal Diversity 18:117-133
- Pongthep K *Corynespora* disease of *Hevea* in Thailand. In: *Proceedings of the IRRDB Symposium*, Chiang Mai, Thailand, 2-3rd Nov, 1987. pp 1-17
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2008) Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annual Review of Phytopathology 49 (1):291-315. doi:doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081831
- Powell RG, Petroski RJ (1992) Alkaloid Toxins in Endophyte-Infected Grasses. Natural toxins 1:163-170
- Prompttha I, Hyde K, McKenzie E, Peberdy J, Lumyong S (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? Fungal Diversity 41 (1):89-99. doi:10.1007/s13225-010-0024-6
- Prompttha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EH, Hyde KD, Jeewon R (2007) A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microbial Ecology 53 (4):579-590
- Prompttha I, Lumyong S, Lumyong P, MacKenzie EHC, Hyde KD (2002) Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. Fungal Diversity 10:89-100
- Pryce-Jones E, Carvert T, Gurr SJ (1999) The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis f.sp.hordei*. Physiological and Molecular Plant Pathology 55 (3):175-182
- Purwantara A (1987) A histological study of hevea leaves infected by *Corynespora cassiicola*. Menara Perkebunan 55:47-49
- Purwantara A, Pawirosoemardjo S (1991) Symptom development and spore dissemination of *Corynespora* leaf fall disease on Hevea rubber clone PPN 2058. Menara Perkebunan 59:33-37
- Qi Y, Xie Y, Zhang X, Pu J, Zhang H, Huang S, Zhang H (2009) Molecular and Pathogenic Variation Identified Among Isolates of *Corynespora cassiicola*. Molecular Biotechnology 41 (2):145-151
- Qi YX, Zhang X, Pu JJ, Liu XM, Lu Y, Zhang H, Zhang HQ, Lv XC, Xie YX (2011) Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. European Journal of Plant Pathology 130 (1):83-95
- R\_Development\_Core\_Team (2009) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria

- Radzia NZ, Sulong SH, Hidir S (1996) The epidemiology of *Corynespora* leaf fall disease of rubber in Malaysia - conidia dispersal pattern. Workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease of *Hevea* Rubber organised by the Indonesian Rubber Research Institute (Medan, Indonésie):p26-27
- Rafiqi M, Gan PHP, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR, Dodds PN (2010) Internalization of Flax Rust Avirulence Proteins into Flax and Tobacco Cells Can Occur in the Absence of the Pathogen. *The Plant Cell* 22 (6):2017-2032. doi:10.1105/tpc.109.072983
- Rahman MA (1988) Diseases of *Hevea brasiliensis* in Bangladesh. *Bano Biggyyan Patrika* 17:73–79.
- Rajalakshmy VK, Kothandaraman R Current status of *Corynespora* leaf fall in India. In: Workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease of *Hevea* Rubber organised by the Indonesian Rubber Research Institute (Medan, Indonésie), 1996. pp 12-16
- Ramakrishnan TS, Pillay PNR (1961) Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei. *Rubber Board Bulletin*, 5:32-35
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PRJ, Beynon JL (2005) Differential Recognition of Highly Divergent Downy Mildew Avirulence Gene Alleles by *RPP1* Resistance Genes from Two *Arabidopsis* Lines. *The Plant Cell* 17 (6):1839-1850. doi:10.1105/tpc.105.031807
- Rep M, Van Der Does HC, Meijer M, Van Wijk R, Houterman PM, Dekker HL, De Koster CG, Cornelissen BJC (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53 (5):1373-1383. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Rhoads DM, Levings CS, Siedow JN (1995) URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27 (4):437-445. doi:10.1007/bf02110006
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101:948-955
- Robeson DJ, Strobel GA, Strange RN (1985) The Identification of a Major Phytotoxic Component from *Alternaria macrospora* as ab-Dehydrocurvularin. *Journal of Natural Products* 48 (1):139-141. doi:10.1021/np50037a028
- Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araujo IS, Mattos CRR, Goes-Neto A (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47:75-84
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182 (2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng Y-Q, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102 (6):1318-1338. doi:10.3852/09-244
- Rolke Y, Liu S, Quidde T, Williamson B, Schouten A, Weltring K-M, Siewers V, Tenberge KB, Tudzynski B, Tudzynski P (2004) Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis*

- cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* 5 (1):17-27. doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x
- Romruensukharom P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Toojinda T (2005) Genetic variability of *Corynespora cassiicola* population in Thailand. *Journal of Rubber Research* 8 (1):38-49
- Ron M, Avni A (2004) The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* 16 (6):1604-1615
- Ronald PC, Salmeron JM, Carland FM, Staskawicz BJ (1992) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology* 174 (5):1604-1611
- Rooney HCE, van't Klooster JW, van der Hoorn RAL, Joosten MHAJ, Jones JDG, de Wit PJGM (2005) *Cladosporium Avr2* Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* 308 (5729):1783-1786. doi:10.1126/science.1111404
- Saha T, Kumar A, Sreena AS, Joseph A, Jacob CK, Nazeer MA (2000) Genetic Variability of *Corynespora cassiicola* infecting *Hevea brasiliensis* isolated from the traditional rubber growing areas in India. *Journal of Natural Rubber Research* 13:1-10
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425
- Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bès M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PBF, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa*) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics* 106 (8):1396-1408. doi:10.1007/s00122-002-1184-x
- Sarma GN, Manning VA, Ciuffetti LM, Karplus PA (2005) Structure of Ptr ToxA: an RGD-containing host-selective toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Cell* 17:3190-3202
- Sarma YR, nayudu MV (1975) Toxin production by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. *Current Science* 44:172
- Schlub RL, Smith LJ, Datnoff LE, Pernezny K (2009) An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Horticulturae* 808:25-28
- Schoch CL, W CP, Z GJ, A BEW, I BT, de Gruyter J G S de Hoog LJD, M. Grube, C. Gueidan, Y., Harada SH, K. Hirayama, T. Hosoya, S.M. Huhndorf, K.D. Hyde, E.B.G. Jones, J. Kohlmeyer, Å. Kruys, Y.M. Li, R. Lücking,, H.T. Lumbsch LM, J.S. Mbatchou, A.H. McVay, A.N. Miller, G.K. Mugambi, L. Muggia, M.P. Nelsen, P. Nelson,, C A. Owensby AJLP, S. Phongpaichit, S.B. Pointing, V. Pujade-Renaud, H.A. Raja, E. Rivas Plata, B. Robbertse, C., Ruibal JS, T. Sano, L. Selbmann, C.A. Shearer, T. Shirouzu, B. Slippers, S. Suetrong, K. Tanaka, B. Volkmann-, Kohlmeyer MJW, A.R. Wood, J.H.C.Woudenberg, H. Yonezawa, Y. Zhang, J.W. Spatafora (2009) A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. *Studies in Mycology* 64: 1-15
- Schornack S, Ballvora A, G rlebeck D, Peart J, Ganai M, Baker B, Bonas U, Lahaye T (2004) The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates

- defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *The Plant Journal* 37 (1):46-60. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01937.x
- Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (40):17421-17426. doi:10.1073/pnas.1008491107
- Segmüller N, Kokkelink L, Giesbert S, Odinius D, van Kan J, Tudzynski P (2008) NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (6):808-819. doi:10.1094/mpmi-21-6-0808
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RAL (2008) Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *Plant Cell* 20 (4):1169-1183
- Shamsul KAS, Shamsuri MH Current status of *Corynespora* leaf fall in Malaysia. In: *Proceeding of the workshop on Corynespora Leaf Fall disease*, Medan, Indonesia, 1996. pp 21-28
- Shan W, Cao M, Leung D, Tyler BM (2004) The *Avr1b* Locus of *Phytophthora sojae* Encodes an Elicitor and a Regulator Required for Avirulence on Soybean Plants Carrying Resistance Gene *Rps1b*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (4):394-403. doi:10.1094/mpmi.2004.17.4.394
- Shanmugam V, Sriram S, Babu S, Nandakumar R, Raguchander T, Balasubramanian P, Samiyappan R (2001) Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -glucosidase protein from *Trichoderma viride* which degrades a phytotoxin associated with sheath blight disease in rice. *Journal of Applied Microbiology* 90 (3):320-329. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01248.x
- Shimodaira H, Hasegawa M (1999) Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution* 16 (8):1114
- Siedow JN, Rhoads DM, Ward GC, Levings CS (1995) The relationship between the mitochondrial gene *T-urf13* and fungal pathotoxin sensitivity in maize. *Biochimica et Biophysica Acta* 1271 (1):235-240
- Silva WP, Karunanayake EH, Wijesundera RL, Priyanka UM (2003) Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycological Research* 107:567-571
- Silva WPK, Deverall BJ, Lyon BR (1998) Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 47 (3):267-277
- Sinulingga W, Suwanto, Soepena H Current status of *Corynespora* leaf fall on Hevea rubber in Indonesia. In: *Proceeding of the workshop on Corynespora Leaf Fall Disease*, Medan, Indonesia, 1996. pp 7-11
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology* 62 (1):227-250. doi:doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103846

- Smith SE, Smith FA (2012) Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104 (1):1-13. doi:10.3852/11-229
- Song J, Win J, Tian MY, Schornack S, Kaschani F, Ilyas M, van der Hoorn RAL, Kamoun S (2009) Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (5):1654-1659
- Song WY, Pi LY, Wang GL, Gardner J, Holsten T, Ronald PC (1997) Evolution of the Rice *Xa21* Disease Resistance Gene Family. *The Plant Cell* 9:1279-1287
- Steele JA, Durbin RD, Uchytel TF, Rich DH (1978a) Tentoxin An uncompetitive inhibitor of lettuce chloroplast coupling factor 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 501 (1):72-82
- Steele JA, Uchytel TF, Durbin RD, Bhatnagar PK, Rich DH (1978b) The stimulation of coupling factor 1 ATPase by tentoxin and its analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 84 (1):215-218
- Strelkov SE, Kowatsch RF, Ballance GM, Lamari L (2006) Characterization of the *ToxB* gene from North African and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67 (3-5):164-170
- Strelkov SE, Lamari L, Ballance GM (1999) Characterization of a hostspecific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:728-732
- Strelkov SE, Lamari L, Bannace GM, Orolaza NP Isolation and mode of action of PTR chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. In: *Molecular Genetics of Host-specific Toxins in Plant Disease* (Kohmoto, K. & Yoder, O. C., eds), Dordrecht., 1998. Kluwer Academic Publishers., pp 137-138
- Styer CH, Cutler HG (1984) Effects of Moniliformin on Mitosis in Maize (*Zea mays* L.). *Plant and Cell Physiology* 25 (6):1077-1082
- Suryanarayanan T, Murali T, Thirunavukkarasu N, Govinda Rajulu M, Venkatesan G, Sukumar R (2011) Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation* 20 (5):913-928. doi:10.1007/s10531-011-0004-5
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G (2002) Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 80:818-826
- Swofford DL (2000) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tai YS, Bragg J (2007) Dual applications of a virus vector for studies of wheat-fungal interactions. *Biotechnology* 6:288-291
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739
- Tejesvi MV, Kukkundoor R, Kini KR, Harishchandra S, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS (2003) Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* 24:37-54
- Teoh CH (1983) *Corynespora* leaf fall of *Hevea* in West Java. *Malaysian Plant Protection Society Newsletter* 7:12-13
- Thomma BPHJ, Van Esse HP, Crous PW, De Wit PJGM (2005) *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology* 6 (4):379-393. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x
- Thuleau P, Graziana A, Rossignol M, Kausst H, Auriol P, Ranjeva R (1988) Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5932-5935
- Tomas A, Feng GH, Reeck GR, Bockus WW, Leach JE (1990) Purification of a Cultivar-Specific Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, Causal Agent of Tan Spot of Wheat. *Molecular Plant Microbe-Interactions* 3 (4):221-224
- Tucker SL, Talbot NJ (2001) Surface Attachment And Pre-Penetration Stage Development By Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39 (1):385-417. doi:doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.385
- Tudzynski P, Scheffer JAN (2004) *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology* 5 (5):377-388. doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00237.x
- Tuori RP, Wolpert TJ, Ciuffetti LM (1995) Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8 (1):41-48
- Tuori RP, Wolpert TJ, Ciuffetti LM (2000) Heterologous Expression of Functional Ptr ToxA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (4):456-464. doi:10.1094/mpmi.2000.13.4.456
- Umemoto N, Kakitani M, Iwamatsu A, Yoshikawa M, Yamaoka N, Ishida I (1997) The structure and function of a soybean b-glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (3):1029-1034
- Underwood W, Zhang S, He SY (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 52 (4):658-672. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03262.x
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHJ, Vervoort J, de Wit PJGM (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (12):1420-1430. doi:10.1094/mpmi-19-1420
- Van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* 20 (8):2009-2017



- Van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ (2007) The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. The American Phytopathological Society 20 (9):1092–1101
- Van Esse HP, Van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, Van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, De Wit PJGM, Thomma BPHJ (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. The Plant Cell 20 (7):1948-1963
- Van Parijs J, Broekaert W, Goldstein I, Peumans W (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. Planta 183:258–264
- Voegelé RT, Mendgen K Nutrient uptake in rust fungi: How sweet is parasitic life? In: BGRI 2010 Technical Workshop, St Petersburg, Russia, 30-31- May 2010.
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (14):8133-8138. doi:10.1073/pnas.131186798
- Wahounou PJ, Tran Van Canh C, Keli JZ, Eschbach JM Development of *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum gloeosporioides* leaf fall diseases in rubber plantation in Africa. In: *Proceeding of the workshop on Corynespora Leaf Fall disease*, Medan, Indonesia, 1996. pp 99-106.
- Wäli PR, Helander M, Nissinen O, Saikkonen K (2006) Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). Canadian Journal of Botany 84 (7):1043-1051. doi:doi:10.1139/b06-075
- Walton JD (1996) Host-Selective Toxins: Agents of Compatibility. The Plant Cell 8:1723-1733
- Walton JD (2006) HC-toxin. Phytochemistry 67 (14):1406-1413
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G (2008) A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 20 (2):471-481
- Wang GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S, Ronald PC (1996) The Cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolates in Transgenic Plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 9 (9):850-855
- Wevelsiep L, Rüpping E, Knogge W (1993) Stimulation of Barley Plasmalemma Peptides from the Fungal Pathogen H<sup>+</sup>-ATPase by Phytotoxic *Rhynchosporium secalis*. Plant Physiology 101:297-301
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany 82:1198-1227
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. Nature 450 (7166):115-118
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego
- Whitham S, Dineshkumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The Product Of The Tobacco Mosaic-Virus Resistance GeneN

- Similarity To Toll And The Interleukin-1 Receptor. *Cell* 78 (6):1101-1115. doi:10.1016/0092-8674(94)90283-6
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, Kamoun S (2007) Adaptive Evolution Has Targeted the C-Terminal Domain of the RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. *The Plant Cell* 19 (8):2349-2369. doi:10.1105/tpc.107.051037
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) HOST-SELECTIVE TOXINS AND AVIRULENCE DETERMINANTS: What's in a Name? *Annual Review of Phytopathology* 40 (1):251-285. doi:doi:10.1146/annurev.phyto.40.011402.114210
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou J-M (2008) *Pseudomonas syringae* Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current biology* : CB 18 (1):74-80
- Yang G, Rose MS, Turgeon BG, Yoder OC (1996) A Polyketide Synthase Is Required for Fungal Virulence and Production of the Polyketide T-Toxin. *The Plant Cell* 8 (11):2139-2150. doi:10.1105/tpc.8.11.2139
- Yeang HY (2007) Synchronous flowering of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) induced by high solar radiation intensity. *New Phytologist* 175:283-289
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou J-M (2007) A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* 1 (3):175-185